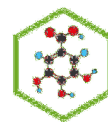


GRUPO POLIFENOLES UTP



**Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de *Miconia caudata*,
Miconia sp, *Clidemia hirta* y *Hamelia patens*; frente a los hongos
Aspergillus niger y *Candida albicans*.**

TRABAJO DE GRADO

Requisito parcial para optar al título de Tecnólogo Químico

Presentado por:

NATALIA DUQUE BETANCUR

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA

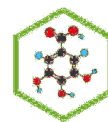
FACULTAD DE TECNOLOGÍA

PROGRAMA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA

PEREIRA

2008

GRUPO POLIFENOLES UTP



**Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de *Miconia caudata*,
Miconia sp, *Clidemia hirta* y *Hamelia patens*; frente a los hongos
Aspergillus niger y *Candida albicans*.**

TRABAJO DE GRADO

Requisito parcial para optar al título de Tecnólogo Químico

Presentado por:

NATALIA DUQUE BETANCUR

Directora:

Luz Stella Ramírez

Docente Programa de Tecnología Química

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA

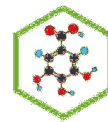
FACULTAD DE TECNOLOGÍA

PROGRAMA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA

PEREIRA

2008

GRUPO POLIFENOLES UTP



NOTA DE ACEPTACIÓN DEL TRABAJO DE GRADO

Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de *Miconia caudata*, *Miconia l.*, *Clidemia hirta* y *Hamelia patens*; frente a los hongos *Aspergillus niger* y *Candida albicans*.

Presentado por:

NATALIA DUQUE BETANCUR

La suscrita directora y jurados del presente trabajo de grado, una vez revisada la versión escrita y presenciado la sustentación oral, decidimos otorgar la nota de:

Con la connotación:

Para constancia firmamos en la ciudad de Pereira hoy
_____.

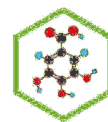
El director: _____

Nombre: Luz Stella Ramírez

Jurado: _____

Nombre:

GRUPO POLIFENOLES UTP



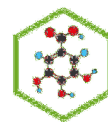
Dedicatoria

Antes que todo a Dios por que sin su ayuda nada
hubiera sido posible.

A mi familia por su amor y confianza,
Especialmente a mi Madre y a mis hermanas Sandra y Beatriz
por permitirme estudiar y hacer realidad mis sueños.

A todos los que creyeron en mí y en que lo lograría,
Aquellos que estuvieron a mi lado para escucharme, orientarme y
brindarme una sincera amistad.

GRUPO POLIFENOLES UTP



Agradecimientos

A la profesora LUZ STELLA RAMIREZ por brindarme la oportunidad de trabajar con ella, por su paciencia y sus enseñanzas.

Al grupo de investigación: POLIFENOLES de la Universidad Tecnológica de Pereira, por su colaboración durante el desarrollo del trabajo de investigación, en los procesos de extracción del material vegetal y evaluación de la actividad antifúngica.

Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAN), por su colaboración durante el desarrollo de este proyecto.

A la Universidad Industrial de Santander (UIS) por la donación de la cepa de *A. niger* y a la facultad de ciencias de la salud de la UTP por la cepa de *C. albicans*.

Al Coordinador de Conservación e Investigación del Jardín Botánico de la UTP, Dorian Ruíz Penagos por su ayuda en la recolección de las plantas objeto de este estudio.

Al excelente grupo de trabajo de la escuela de Tecnología Química, docentes y administrativos por su enseñanza y colaboración.

GRUPO POLIFENOLES UTP

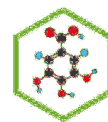
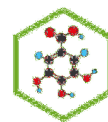


TABLA DE CONTENIDO

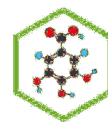
	Pág.
NOTA DE ACEPTACION DEL TRABAJO	<i>i</i>
Dedicatoria	<i>ii</i>
Agradecimientos	<i>iii</i>
Tabla de contenido	<i>iv</i>
Índice de tablas	<i>vii</i>
Índice de figuras	<i>viii</i>
RESUMEN	<i>x</i>
ABSTRACT	<i>xi</i>
INTRODUCCIÓN	<i>xii</i>
1. ANTECEDENTES	1
1.1. Planteamiento del problema	1
1.2. Formulación del problema	3
1.3. Objetivos	3
1.3.1. Objetivo general	3
1.3.2. Objetivos específicos	4
1.4. Justificación	4
2. MARCO TEORICO	8
2.1. Propiedades generales de los hongos	8
2.1.1. Genero <i>Aspergillus</i>	8
2.1.1.1. Descripción general	8
2.1.1.2. Taxonomía	11
2.1.2. Especie <i>Aspergillus niger</i>	11
2.1.2.1. Descripción general	11
2.1.2.2. Morfología	12

GRUPO POLIFENOLES UTP



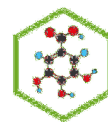
	Pág.
2.1.2.2.1. Características macroscópicas	12
2.1.2.2.2. Características microscópicas	12
2.1.2.3. Epidemiología	13
2.1.2.4. Cultivo	15
2.1.3. Genero <i>Candida</i>	15
2.1.3.1. Descripción general	15
2.1.3.2. Morfología e identificación	15
2.1.3.3. Taxonomía	16
2.1.3.4. Patogenia y patología	16
2.1.4. Especie <i>Candida albicans</i>	17
2.1.4.1. Descripción general	17
2.1.4.2. Morfología	18
2.1.4.3. Ecología	19
2.1.4.4. Epidemiología	19
2.1.4.4.1. Infecciones de las mucosas	20
2.1.4.4.2. Infecciones de órganos profundos	20
2.1.4.4.3. Vaginitis	20
2.1.4.5. Cultivo	21
2.2. Antimicóticos	21
2.3. Familia Melastomataceae	23
2.4. Familia Rubiaceae	25
2.5. Descripción del método de perforación en placas	27
2.6. Descripción del método de microdilución	29
2.7. Descripción del método de macrodilución	30
2.8. Selección del material vegetal	30
3. SECCIÓN EXPERIMENTAL	32
3.1. Material vegetal	32
3.2. Procedimiento general de extracción del material vegetal	32

GRUPO POLIFENOLES UTP



	Pág.
3.3. Cultivo del inóculo	35
3.4. Preparación de antibióticos estándar y muestra problema	35
3.5. Evaluación de la actividad antifúngica	36
3.5.1. Método kirby-bauer modificado a perforación en placa	36
3.5.1.1 Método de Difusión en Agar frente a <i>C. albicans</i>	36
3.5.1.2 Método de Difusión en Agar frente a <i>A. niger</i>	38
3.5.2. Método de microdilución en caldo	40
3.5.3. Método de macrodilución en caldo	43
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
4.1. Evaluación de la actividad antifúngica	46
CONCLUSIONES	57
RECOMENDACIONES	58
ANEXOS	60
BIBLIOGRAFIA	63

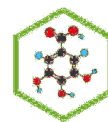
GRUPO POLIFENOLES UTP



Índice de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Aspergillus</i>	11
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>Candida</i>	16
Tabla 3. Características de los antimicóticos más comúnmente usados	22
Tabla 4. Sistema de clasificación de las Melastomataceae	23
Tabla 5. Características generales de la familia Melastomataceae	24
Tabla 6. Características generales de la familia Rubiaceae	26
Tabla 7. Resumen de las plantas objeto de estudio de la actividad antifúngica	32
Tabla 8. Condiciones de conservación de los microorganismos evaluados	35
Tabla 9. Resultados de la actividad antifúngica de extractos en fase acuosa por el método de difusión en agar	48
Tabla 10. Resultados de la actividad antifúngica de extractos en fase butanólica por el método de difusión en agar	49

GRUPO POLIFENOLES UTP



Índice de figuras

	Pág.
Figura 1. Imagen microscópica del <i>Aspergillus</i>	9
Figura 2. Principales características morfológicas del genero <i>Aspergillus</i>	10
Figura 3. Cabeza conoidal de <i>Aspergillus niger</i>	12
Figura 4. Crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> en caja de petri	12
Figura 5. Imagen microscópica de <i>Aspergillus niger</i>	13
Figura 6. Blastoconidios de <i>Candida albicans</i>	17
Figura 7. Crecimiento de <i>Candida albicans</i> en Sabouraud Dextrosa Agar	18
Figura 8. Planta <i>Miconia</i> sp	25
Figura 9. Hojas de la planta <i>Clidemia hirta</i>	25
Figura 10. Planta característica de la familia Rubiaceae	27
Figura 11. Planta y flor <i>Hamelia patens</i>	27
Figura 12. Diagrama de extracción de las fases acuosa y butanólica de las plantas objeto de estudio	34
Figura 13. Diagrama de la evaluación actividad antifúngica por difusión para <i>C. albicans</i>	37
Figura 14. Diagrama de evaluación actividad antifúngica por difusión para <i>Aspergillus niger</i>	39
Figura 15. Diagrama de evaluación antifúngica, método de microdilución en caja de 96 pozos	42
Figura 16. Diagrama de evaluación actividad antifúngica, método macrodilución	45
Figura 17. Prueba confirmatoria, ensayo de microdilución	50
Figura 18. Actividad antifúngica de los extractos en fase acuosa contra el hongo <i>Candida albicans</i> , por el método de macrodilución en caldo	51
Figura 19. Actividad antifúngica del extracto acuosos de <i>Miconia caudata</i> frente a <i>C. albicans</i> .	52

GRUPO POLIFENOLES UTP

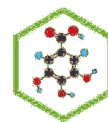
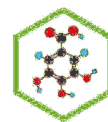


Figura 20. Actividad antifúngica del extracto en fase acuosa de <i>Clidemia hirta</i> frente a <i>C. albicans</i>	53
Figura 21. Actividad antifúngica de los extractos butanolicos contra el hongo <i>Candida albicans</i> , por el método de macrodilución en caldo.	54
Figura 22. Comparación de crecimiento frente al extracto <i>Hamelia patens</i> butanolico	54
Figura 23. Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos acuosos y butanolicos frente <i>A. niger</i>	55

GRUPO POLIFENOLES UTP

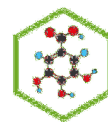


RESUMEN

Los extractos crudos de tres especies de plantas pertenecientes a la familia Melastomataceae y una especie perteneciente a la familia Rubiaceae fueron obtenidos en fase acuosa y butanólica, por medio de extracciones sólido-líquido y líquido-líquido. La actividad antifúngica *In Vitro* de estos extractos a concentraciones de 100000, 50000, 25000, 10000, 5000 y 2500 mg/L en DMSO al 99% fue evaluada frente al hongo *Aspergillus niger* y la levadura *Candida albicans* utilizando la técnica de difusión en agar. Ante la no difusión de los extractos en el medio de cultivo se procedió a la determinación por el método de microdilución con MTT; el cual reaccionó a largo plazo con el medio de cultivo utilizado (Sabouraud al 0.5%) dando coloración aun en ausencia de inóculo.

Por ultimo la actividad antifúngica de estos extractos fue evaluada por macrodilución en tubos a concentraciones del 5%, 3% y 1% m/v contra *Candida albicans* a una absorbancia de 0,1 ($\lambda = 495$ nm) y *Aspergillus niger* al 0.05% m/v. Concluyendo que los extractos acuosos de *Miconia sp* 5%, *Miconia caudata* 5%, *Clidemia hirta* (3 y 5) % y los extractos butanolicos de *Miconia sp* (3 y 5) %, *Miconia caudata* (3 y 5) %, *Clidemia hirta* 5% y *Hamelia patens* (1, 3 y 5) % presentaron actividad antifúngica frente a *Candida albicans*. Mientras *Aspergillus niger* no presentó susceptibilidad a los componentes antifúngicos de los extractos evaluados.

GRUPO POLIFENOLES UTP

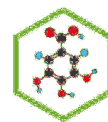


ABSTRACT

The crude extracts of three species of plants belonging to the family Melastomataceae and a species belonging to the family Rubiaceae were obtained in aqueous phase and butanol, using solid-liquid extractions and liquid-liquid. The in vitro antifungal activity of these extracts to concentrations of 100000, 50000, 25000, 10000, 5000 and 2500 mg / L in 99% DMSO was evaluated against the fungus *Aspergillus niger* and yeast *Candida albicans* using the technique of agar diffusion. Given the non-distribution of the extracts in the culture medium led to the determination by the method microdilution with MTT, which react to long-term commitment to the culture medium used (Sabouraud 0.5%) giving coloration even in the absence of inoculum.

Finally the antifungal activity of these extracts was evaluated by macrodilucion in tubes at concentrations of 5%, 3% and 1% m / v against *Candida albicans* to an absorbance of 0.1 ($\lambda = 495$ nm) and *Aspergillus niger* to 0.05% m / v. Concluding that the aqueous extract of Miconia sp 5%, Miconia caudata 5%, Clidemia hirta (3 and 5) % and extracts butanol from Miconia sp (3 and 5) %, Miconia caudata (3 and 5) %, Clidemia hirta 5% And Hamelia patens (1, 3 and 5) % antifungal activity showed opposite *Candida albicans*. Contrary to this none of the extracts evaluated presenting antifungal activity in front of *Aspergillus niger*.

GRUPO POLIFENOLES UTP



INTRODUCCIÓN

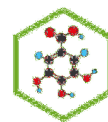
Las enfermedades infecciosas causadas por las bacterias, hongos, virus y parásitos todavía son una amenaza a la salud pública, a pesar del enorme progreso en la medicina. Su impacto es particularmente grande en los países en vía de desarrollo debido a la falta de medicinas y la resistencia a las drogas utilizadas. ^[1]

Candida albicans es el agente causante de más del 80% de las infecciones clínicas por hongos. La patogenicidad de las especies de *Candida* derivan su importancia no solo por la severidad de sus infecciones, sino también por su habilidad para desarrollar resistencia contra diferentes drogas antifúngicas. ^[2]

Diferentes especies del género *Aspergillus* son también causantes frecuentes de micosis invasivas, normalmente fatales, en pacientes inmunocomprometidos. Aunque *A. fumigatus* es el agente etiológico más común, otras especies del género como *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* y *A. nidulans* (*Emericella nidulans*) se consideran también responsables de infecciones invasivas. ^[3]

En estos últimos años, el estudio de las plantas medicinales ha ganado importancia, la actividad antimicrobiana de los extractos y productos naturales ha revelado el potencial de las plantas superiores como una fuente de agentes antinfectivos. Estas contienen muchos componentes que son una fuente importante de moléculas biológicamente activas. ^[1] La actividad de diferentes extractos crudos contra diversos microorganismos ha sido comúnmente reportada. Por ejemplo: la actividad antifúngica de los aceites esenciales de tomillo contra *A. flavus*; la evaluación de la actividad *In Vitro* e *In vivo* de *Melaleuca alternifolia* contra *C. albicans*; la evaluación de la actividad de los extractos de *Criptolepis*

GRUPO POLIFENOLES UTP

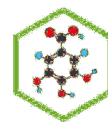


sanganolenta contra algunas bacterias y *Candida albicans*; también se reportó el estudio de la actividad de extractos de diferentes especies pertenecientes al género *Hypericum* contra *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus*.^{[4] [5] [6] [7]}

Teniendo en cuenta la riqueza forestal colombiana y el amplio uso de las plantas en la medicina tradicional se plantea la evaluación de la actividad antifúngica *In Vitro* de las plantas *Miconia caudata*, *Miconia* sp, *Clidemia hirta*, las cuales pertenecen a la familia Melastomataceae; y *Hamelia patens* perteneciente a la familia Rubiaceae, contra el hongo *Aspergillus niger* y la levadura *Candida albicans*; las cuales han sido poco estudiadas en cuanto a su actividad antifúngica *In Vitro* y tienen gran variedad de aplicaciones en la medicina tradicional en los países en vía de desarrollo.

Con los resultados obtenidos con el presente trabajo de investigación, se espera abrir una nueva ventana para el desarrollo de futuros trabajos de investigación en el área química y microbiológica, basados en el fraccionamiento, la cuantificación y caracterización de los compuestos extraídos de estas plantas aquí evaluadas.

GRUPO POLIFENOLES UTP



1. ANTECEDENTES

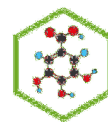
1.1 Planteamiento del problema

Aspergillus es un hongo ampliamente difundido en la naturaleza, que se desarrolla en vegetales en descomposición, granos de cereal almacenados, entre otros; siendo su medio ideal, los ambientes oscuros, húmedos y cerrados; como los edificios en construcción y aparatos de aire acondicionado. Las esporas pueden sobrevivir, en las condiciones adecuadas, durante miles de años. Estudios recientes demostraron que las esporas de *Aspergillus niger* mantienen intacta su capacidad invasiva, e incluso puede aumentar su potencial alergénico después de miles de años. ^{[3] [8]}

Aspergillus niger no causa tantas enfermedades como otras especies de *Aspergillus*, pero en altas concentraciones puede producir aspergilosis, que provoca alteraciones pulmonares. La aspergilosis aparece con más frecuencia en horticultores, ya que inhalan el polvo del hongo con más facilidad. La propagación rápida de *A. niger* en ambientes llenos de polvo y a través de los sistemas de aire acondicionado, puede ser el origen de los brotes de aspergilosis que acontecen en hospitales y otros edificios después de obras. ^[8]

A. niger es un organismo oportunista que generalmente es inofensivo en su ambiente habitual, pero se vuelve patógeno en un huésped comprometido, los cuales tienen disminuida su resistencia a la infección, como es el caso de personas con problemas de malnutrición, alcoholismo, diabetes, leucemia, traumatismo quirúrgico o accidental e inmunodepresión por fármacos, virus o deficiencias genéticas. La principal puerta de entrada de *A. niger* es el aparato respiratorio. Los individuos infectados pueden desarrollar una respuesta alérgica

GRUPO POLIFENOLES UTP



inmediata y sufrir ataques asmáticos cuando son expuestos a los antígenos fúngicos de las conidioesporas. ^[8]

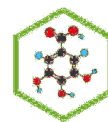
La micosis pulmonar, tiene una alta incidencia en los seres humanos y se ha incrementado debido a su relación con las personas inmunocomprometidas. Los tratamientos convencionales para micosis sistémicas se han limitado debido al acceso restringido de la población a los medicamentos básicos, la pobre eficiencia de la medicina actual, la alta toxicidad y el elevado costo de los medicamentos, y la reincidencia de las infecciones debido a los efectos fungistáticos. Los hongos oportunistas que causan mas comúnmente infecciones pulmonares son *Candida albicans* y *Aspergillus*. ^[7]

Candida albicans es al igual que *A. niger* un microorganismo muy común y distribuido por todo el mundo. Normalmente, se encuentra en pequeñas cantidades en la vagina, en la mucosa bucal, en el tracto digestivo y en la piel sin ocasionar ningún tipo de síntoma o enfermedad. Los síntomas aparecen cuando el equilibrio entre los microorganismos que normalmente habitan en la vagina se pierde y la población de *C. albicans* aumenta en relación con la de los otros microorganismos. ^[9]

C. albicans es la especie más patógena y su virulencia se debe a un conjunto de atributos relacionados con su habilidad para evadir los mecanismos de defensa del huésped, de resistir al tratamiento antifúngico, o de lesionar las células y tejidos que invade. ^{[10][11]}

La candidiasis oral es una de las mas comunes infecciones oportunistas relacionados con el VIH / SIDA, hasta un 90% de las personas infectadas con el VIH experimentan al menos un episodio de candidiasis durante el curso de su enfermedad. *C. albicans* es el más frecuente agente etiológico asociado con esta

GRUPO POLIFENOLES UTP



infección. Además, las cepas de esta especie en pacientes VIH-positivo son más virulentas y genotípicamente alteradas que en pacientes VIH-negativos. Diversos antifúngicos son a menudo prescritos para el tratamiento de la candidiasis oral en Los pacientes VIH-positivos. Sin embargo, una terapia a largo plazo ha conducido a la desarrollo de la resistencia. ^[12]

Lo anteriormente expuesto muestra la importancia de encontrar agentes antifúngicos adecuados para inhibir el crecimiento del *Aspergillus niger* y *Candida albicans*; dado su historial patogénico para el hombre y su resistencia a los antifúngicos tradicionales como los triazoles. Por lo cual a través de este trabajo se analizará la actividad fungicida de varios extractos vegetales como posibles agentes contra estos microorganismos.

1.2 Formulación del problema

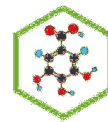
Existe actividad antifúngica en los extractos crudos en las fases acuosa y butanólica de las plantas: *Miconia caudata*, *Miconia* sp, *Clidemia hirta*, pertenecientes a la familia Melastomataceae y *Hamelia patens* perteneciente a la familia Rubiaceae que permitan combatir el hongo *Aspergillus niger* (DSM 821) y la levadura *Candida albicans* (ATCC 10231), como agentes infecciosos.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antifúngica de los extractos acuosos y butanólicos de las especies de plantas: *Miconia caudata*, *Miconia* sp, *Clidemia hirta*, de la familia

GRUPO POLIFENOLES UTP



Melastomatacea y *Hamelia patens* de la familia Rubiaceae frente a los hongos *Aspergillus niger* (DSM 821) y *Candida albicans* (ATCC 10231).

1.3.2 Objetivos específicos

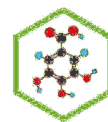
- Determinar el efecto antifúngico de los extractos vegetales crudos en fase acuosa y butanólica.
- Establecer el porcentaje de inhibición de cada extracto frente a los microorganismos evaluados.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los extractos frente al hongo inhibido.

1.4 Justificación

El planeta tierra cuenta con más de 500.000 especies de plantas de las cuales América Latina posee la mayor variedad, alrededor de 100.000; Colombia es el segundo país del mundo más rico en especies vegetales después de Brasil; poseemos alrededor de 49.000 especies vegetales.^[13]

Desde hace años el empleo de las plantas medicinales y de productos derivados de las mismas, esta aumentando de manera importante. Muchos países se han involucrado en la obtención de medicamentos a partir de las plantas, la ONU ha estimado que el ochenta por ciento de los habitantes de los países en vía de desarrollo dependen de las plantas medicinales para satisfacer sus necesidades primarias de salud; estos países poseen los primeros lugares en estos programas de estudio para garantizar la obtención de preparados asequibles a toda la población.^[14]

GRUPO POLIFENOLES UTP



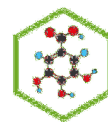
El eje cafetero cuenta con un buen número de plantas con excelente potencial medicinal y comercial; se tiene además un valioso conocimiento cultural empírico y tradicional de nuestra población, en especial la rural, que ha usado estas prácticas medicinales durante mucho tiempo. ^[13]

El aislamiento de sustancias bioactivas provenientes de productos naturales especialmente plantas para la elaboración de nuevos medicamentos, ha aumentado en los últimos años, debido en gran parte a la gran biodiversidad y a problemas de toxicidad y altos costos de los fármacos sintéticos. ^[13]

La actividad antifúngica de las plantas ha sido muy estudiada por la resistencia presentada por los microorganismos a los distintos fungicidas comerciales utilizados normalmente en el control de enfermedades de cultivos hortícolas lo que ha estimulado en los últimos años la búsqueda de nuevas sustancias antifúngicas entre los productos naturales, varios de los cuales se han mostrado efectivos contra fitopatógenos tanto *In Vitro* como *In vivo*. ^[15]

En nuestro país existe un gran recurso natural de la familia Melastomataceae la cual ha sido en varias ocasiones objeto de estudio en investigaciones microbiológicas; algunas especies de la familia han sido usadas en Colombia como medicina tradicional para el tratamiento de la malaria, heridas de la piel, enfermedades respiratorias, cálculos en la vejiga y otras dolencias genitourinarias, como diuréticos y remedios tópicos para irritaciones de las encías. La cocción de los tallos o toda la parte aérea de *Arthrostenia valubile* (Blompl. Ex Naudin) Triana y *A. macrodesmum gleason* se utiliza para bajar la fiebre, especialmente en el tratamiento de la malaria. La cocción de toda la planta de *Brachyotum strigosum* (L. f.) Triana, es usada contra cálculos en la vejiga y otras enfermedades del tracto genitourinario. ^[16]

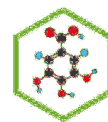
GRUPO POLIFENOLES UTP



En Indonesia, Malasia y China algunos géneros de esta familia, como *Melastoma*, *Medillina* y *Obsequia*; han sido usados como remedio para diarrea, disentería, leucorrea y varias enfermedades de la piel; como astringente y hemostático. En China, la cocción de las hojas de *Melastoma dodecandrum* Lour es utilizada como lavado para hemorroides, dermatitis, lepra, sarna, pie de atleta y como antiabortivo. El jugo de las raíces es consumido como un remedio para el dolor abdominal en el postparto y disenterías. Toda la planta puede ser usada como un antipirético tradicional, antitóxico, diurético, hemostático y medicina antirreumática. El extracto de toda la planta en acetona al 80 % exhibe actividad antialérgica. ^[16]
^[17]

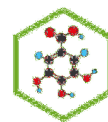
Por otro lado, la familia Rubiaceae es también una de las fuentes primarias de productos naturales (medicina, alucinógenos y venenos). Muchos géneros de Cinchoneae (*Cinchona*, y *Ladenbergia*) son fuentes de quina, el único remedio para la malaria hasta que se puso disponible la droga sintética. La malaria es responsable de gran número de muertes en la historia humana especialmente en los países tropicales del mundo. EL género *Pogonopus* y varios otros son las fuentes de compuestos activos de pruebas y actividad anticancerígena, eso involucra la inhibición de la formación de microtubulos durante la división celular. La especie *Morinda citrifolia* (el noni) ha recibido atención considerable recientemente por sus propiedades medicinales que reduce la presión alta de la sangre y sirve como un agente anticancerígeno. El género *Uncaria* (uña de gato), tiene numerosos reportes de usos medicinales por médicos naturistas en el Perú. Los extractos de corteza de la especie *Pausynistalia yohimbe*, una liana originaria de África es la fuente de un potente afrodisíaco. *Psychotria viridis* y especies relacionadas son usadas en importantes ingredientes en la producción de alucinógenos (ayahuasca en la amazonía). Varias especies de los géneros *Psychotria* y *Palicourea* son plantas venenosas responsables para la parálisis del ganado y muerte en América Tropical. ^[18]

GRUPO POLIFENOLES UTP



La planta *Hamelia patens* de la familia Rubiaceae y perteneciente a la flora colombiana es considerada una planta medicinal con propiedades analgésicas, antibacterianas, antifúngicas, antiinflamatorias, diuréticas, etc. La cual en algunas regiones de Cundinamarca emplean sus raíces en decocción como diurético. Las hojas en decocción o en zumo son usadas como remedio contra la sarna en forma de baños o cataplasmas. También las hojas son usadas para el dolor de cabeza, colocadas sobre la frente. ^[19] ^[20]

El grupo de Investigación en Polifenoles de la Universidad Tecnológica de Pereira, ha realizado diversos estudios a plantas de la familia Melastomataceae, entre otras; la cual es rica en fenoles y en polifenoles que han demostrado actividad biológica en pruebas preliminares, siguiendo estas investigaciones y dada la efectividad de las plantas como fuente medicinal en sus diferentes usos tradicionales, se plantea el estudio de tres especies de la familia *Melastomataceas* y una especie de la Rubiaceae.



2. MARCO TEORICO

2.1 Propiedades Generales de los Hongos

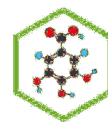
Los hongos crecen en dos formas básicas: **levaduras y mohos**. El crecimiento en forma de moho produce colonias filamentosas multicelulares. Estas colonias consisten en tubulos cilíndricos ramificados denominados **hifas**, cuyo diámetro varia de 2 a 10 μm . La masa de hifas enmarañadas que se acumula durante el crecimiento activo es un **micelio**. Algunas están divididas en celdillas por paredes transversas o **tabiques** (septos), formados típicamente a intervalos regulares durante el crecimiento de la hifa. Las hifas que penetran al medio de apoyo y absorben nutrientes son las hifas vegetativas o del sustrato. Por el contrario las hifas aéreas se extienden por encima de la superficie del micelio y habitualmente poseen las estructuras reproductivas del moho. ^[22] Las levaduras son células únicas, habitualmente de forma esférica a elipsoide cuyo diámetro varía de 3 a 15 μm . La mayor parte de las levaduras se reproducen por gemación. Algunas especies producen yemas que típicamente no se desprenden y se alargan; y entonces el proceso continuo de gemación produce una cadena de células alargadas de levaduras denominadas **seudohifas**. Las colonias de levaduras habitualmente son blandas, opacas, de 1 a 3 mm de longitud, y de color crema. ^[22]

2.1.1 Genero *Aspergillus*

2.1.1.1 Descripción general

El género *Aspergillus* fue descrito por primera vez en 1729 por *P. A. Micheli*, quien comprobó que la cabeza conidial de este hongo se parecía a un "aspergillum" (instrumento utilizado para dispersar el agua bendita). ^[23]

GRUPO POLIFENOLES UTP



Aspergillus es un hongo filamentososo del grupo *Deuteromycetes* u hongos imperfectos su aspecto microscópico es típico y se caracteriza por unas estructuras esporíferas o reproductoras llamadas cabezas conidiales. Estas cabezas están compuestas por una vesícula rodeada por una corona de fiálides en forma de botella, en cuyo extremo se forman cadenas de esporas. ^[8](Ver figura 1)

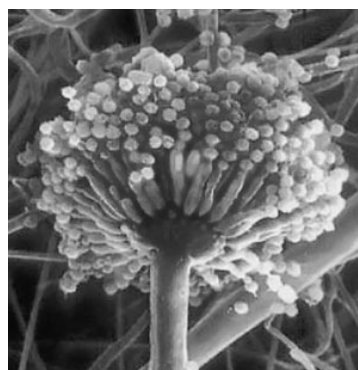
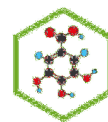


Figura1. Imagen microscópica de *Aspergillus*^[24]

Las especies de *Aspergillus* crecen con rapidez, produciendo hifas aéreas que poseen estructuras conoidales características, estas se identifican según sus diferencias morfológicas en estas estructuras, las cuales incluyen tamaño, forma, textura y color del conidio. Se conocen unas 900 especies de *Aspergillus*, que *Rapper* y *Fennell* clasifican en 18 grupos, de los que sólo 12 se relacionan con enfermedad humana: *Aspergillus fumigatus* (85%), *A. flavus* (5-10%), *A. niger* (2-3%), *A. terreus* (2-3%), *A. versicolor*, *A. nidulans*, *A. glaucus*, *A. clavatus*, *A. cervinus*, *A. candidus*, *A. flavipes* y *A. ustus*. Esta clasificación se basa en las siguientes características morfológicas del hongo: tamaño y forma de las cabezas conidiales, morfología de los conidióforos, fiálides y métulas, y en la presencia de células de Hülle y de esclerocios. ^[23]

GRUPO POLIFENOLES UTP



Aspergillus es un género mitospórico que se caracteriza por la producción de hifas especializadas, denominadas conidióforos, sobre los que se encuentran las células conidiógenas que originarán las esporas asexuales o conidios. El conidióforo característico de *Aspergillus*, aunque es una estructura unicelular posee tres partes bien diferenciadas: vesícula (extremo apical hinchado), estipe (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula) y célula pie (sección final, a veces separada por un septo, que une el conidióforo con el micelio). Sobre la vesícula se disponen las células conidiógenas, denominadas habitualmente fiálides. En muchas especies, entre la vesícula y las fiálides se encuentran otras células denominadas métulas. Las cabezas conidiales que sólo presentan fiálides se denominan uniseriadas, y las que presentan fiálides y métulas, biseriadas.^[25] En la figura 2 se muestran las principales estructuras morfológicas del género *Aspergillus*:

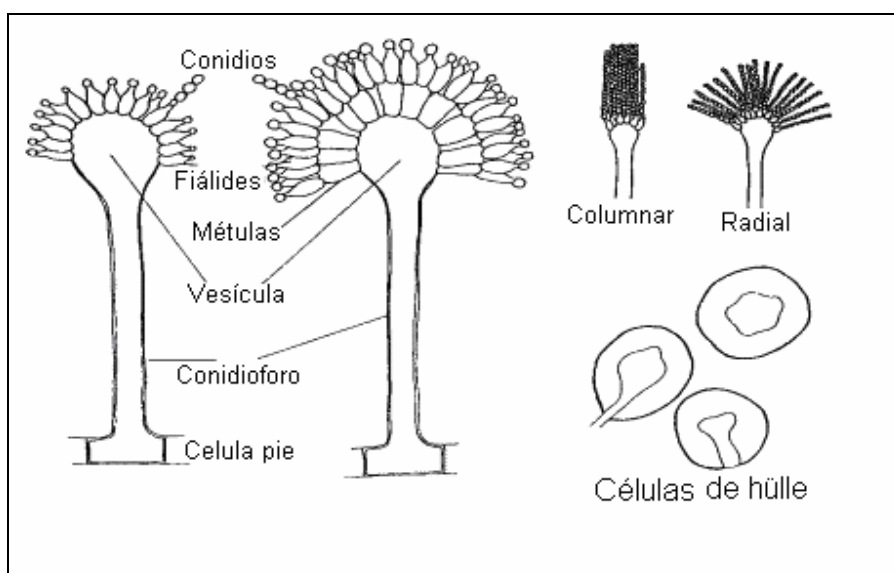
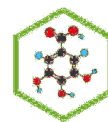


Figura 2. Principales estructuras morfológicas del género *Aspergillus*.^[23]

GRUPO POLIFENOLES UTP



2.1.1.2 Taxonomía

El hongo *Aspergillus* se encuentra actualmente clasificado taxonómicamente como se muestra en la tabla 1:

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Aspergillus*.^[26]

Reino	Fungí
División	<i>Ascomycota</i>
Clase	<i>Eurotiomycetes</i>
Familia	<i>Trichocomaceae</i>
Genero	<i>Aspergillus</i>
Especie	<i>níger</i> y otras especies

2.1.2 Especie *Aspergillus niger*

2.1.2.1 Descripción general

Aspergillus niger tiene el micelio lanoso de color blanco - amarillento que cambia a negro, el reverso es blanco amarillento, conidióforos largos y lisos y fiálides biseriadas que cubren completamente la vesícula (figura 3). Es un hongo que produce un moho negro en vegetales muy común en la lechuga, el tomate y la acelga. Es una de las especies más corrientes del género *Aspergillus* cultivada para la producción de: ácido cítrico, ácido glucónico enzimas: glucoamilasa, galactosidasa, etc.^[8]

GRUPO POLIFENOLES UTP

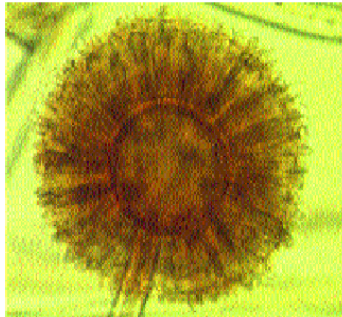
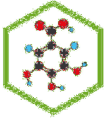


Figura 3. Cabeza conoidal de *Aspergillus*. [3]

2.1.2.2 Morfología

2.1.2.2.1 Características macroscópicas:

Colonias en CYA (Czapek Yeast extract agar), de color negro o marrón muy oscuro; reverso incoloro a amarillo; colonia densa, granular a flocosa. En CY20S (CYA con 20% de sacarosa) las colonias son más compactas. Colonias en MEA (Malt Extract Agar) de color negro; micelio blanco apenas visible; reverso incoloro; textura granular a flocosa. [3] (Figura 4)

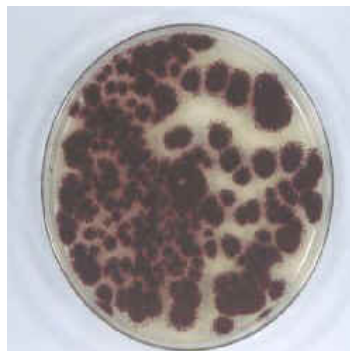
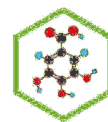


Figura 4. Crecimiento de *A. niger* en caja de petri. [25]

2.1.2.2.2 Características microscópicas:

Cabezas conidiales biseriadas y radiales; estipes de paredes gruesas, lisos, hialinos, amarillentos o de color marrón pálido, en especial cerca de la vesícula.

GRUPO POLIFENOLES UTP



Vesícula casi esférica; métulas ocupando toda la superficie de la vesícula. Conidios globosos de color marrón, normalmente muy rugosos con crestas irregulares y protuberancias. ^[3]



Figura 5. Imagen microscópica de *Aspergillus niger*. ^[27]

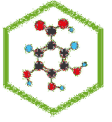
2.1.2.3 Epidemiología

En los pulmones, los macrófagos alveolares pueden ingerir y destruir los conidios. Sin embargo, los macrófagos de animales tratados con corticosteroides o de pacientes inmunocomprometidos muestran menor capacidad para detener el inóculo. En el pulmón el conidio aumenta de volumen y germina para producir hifas que tienden a invadir las cavidades preexistentes o los vasos sanguíneos. ^[28]

El aspergiloma se presenta cuando los conidios inhalados penetran a una cavidad existente, germinan y producen hifas abundantes en el espacio pulmonar anormal. El aspergiloma raras veces es invasor. Las infecciones circunscritas, no invasoras, por especies de *Aspergillus*, pueden afectar los senos paranasales, el conducto auditivo, la cornea o las uñas. ^[28]

Después de la inhalación y de la germinación de los conidios se desarrolla enfermedad invasora como un proceso neumónico agudo con o sin diseminación.

GRUPO POLIFENOLES UTP



Los pacientes en riesgo son aquellos con leucemia linfocítica o mielógena, linfoma, receptores de trasplante de médula ósea, y en especial las personas a quienes se administra corticosteroides. Los síntomas incluyen fiebre, tos, disnea y hemoptisis. Las hifas invaden la luz y las paredes de los vasos sanguíneos y causan trombosis, infarto y necrosis. Desde los pulmones la enfermedad se puede propagar al aparato gastrointestinal, riñón, hígado, cerebro u otros órganos y producir abscesos y lesiones necróticas.^[28]

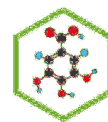
Entre las características de *Aspergillus niger*, implicadas en múltiples procesos patológicos se pueden encontrar:

- El pequeño tamaño de sus conidias que permite que sean aspiradas, causando infección en el pulmón y en los senos paranasales.
- Su capacidad de crecer a 37°C lo que le hace idóneo para afectar al humano.
- Su capacidad de adherencia a superficies epiteliales y posiblemente endoteliales y su gran tendencia a invadir los vasos sanguíneos.
- La producción de un gran número de productos extracelulares tóxicos para las células (elastasa, aflatoxina, fumigatoxina, etc.).^[8]

Los factores intrínsecos que afectan al desarrollo de la enfermedad son los siguientes:

- Predisposición genética a padecer alergia.
- Enfermedades preexistentes: neumopatías, alergias e inmunodeficiencias.
- Hábitos personales: manipulación de objetos contaminados sin medidas de protección como: mascarillas, guantes, ropa protectora.
- Factores laborales: trabajos realizados en lugares con grandes cantidades de polvo y escombros, sin ventilación.^[8]

GRUPO POLIFENOLES UTP



2.1.2.4 Cultivo

Aspergillus niger crece rápidamente en una variedad de sustratos artificiales produciendo colonias que consisten de un fieltro basal blanco o amarillo cubierto por una capa densa de conidios de color castaño oscuro a negro. Las Conidioesporas de esta especie son típicamente de 900-1600 μm de longitud, paredes lisas y termina en las vesículas globosas color café pálido de 40-60 μm de diámetro. ^[26]

2.1.3 Genero *Candida*

2.1.3.1 Descripción general

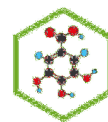
El genero *Candida* comprende mas de 150 especies, cuya principal característica es la ausencia de forma sexual, con excepción de algunas especies. Son clasificadas como levaduras, las cuales corresponden a hongos con un modo de desarrollo predominantemente unicelular. Solamente una docena de las especies pertenecientes al genero *Candida* poseen la facultad de adaptarse a una temperatura de 37°C y ocasionalmente pueden ser patógenas para el hombre, estas especies son entre otras: *C. albicans*, *C. tropicales*, *C. kefyr* (*pseudotropicales*), *C. krusei*, *C. guillermendi*, *C. parakrusei*, *C. reylanvides*, *C. stelladiodea* y *C. brempitii*. ^[29]

La apariencia microscópica de todas las especies de *Candida* es similar, todas las levaduras son Gram positivas, pero en algunas ocasiones la forma de las blastosporas puede variar de ovoide a alargada o esférica. ^[29]

2.1.3.2 Morfología e identificación

En cultivo o tejidos las especies de *Candida* crecen como levaduras ovoides en gemación (3 a 6 μm de tamaño). También forman pseudohifas cuando las yemas continúan su crecimiento pero sin desprenderse, para generar cadenas de células

GRUPO POLIFENOLES UTP



alargadas pinzadas o constreñidas en los tabiques entre las células. *C. albicans* es dimórfica; además de las levaduras y las pseudohifas, también puede producir hifas verdaderas. Sobre medio de agar, o en las primeras 24 horas a 37 °C o temperatura ambiente, las especies de *Candida* producen colonias blandas de color crema. Las pseudohifas se manifiestan como crecimiento bajo la superficie del agar. ^[28]

2.1.3.3 Taxonomía

Los microorganismos involucrados como agentes etiológicos de la candidiasis se encuentran actualmente clasificados taxonómicamente como se muestra en la tabla 2:

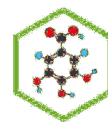
Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Candida*. ^[29]

Reino	Hongo
División	<i>Deuteromycota</i>
Clase	<i>Blastomycetes</i>
Familia	<i>Cryptococcaceae</i>
Genero	<i>Candida</i>
Especie	<i>albicans</i> (como la mas frecuente y virulenta) y otras especies

2.1.3.4 Patogenia y patología

La candidiasis superficial (cutánea o mucosa) se establece a consecuencia de un incremento en la población local de *Candida* y del daño a la piel o el epitelio que permite la invasión local por la levadura y las pseudohifas. Las candidiasis sistémica se presenta cuando *Candida* penetra al torrente sanguíneo y las defensas fagocíticas del huésped son inadecuadas para contener su crecimiento y

GRUPO POLIFENOLES UTP



diseminación. Desde la circulación *Candida* puede infectar los riñones, fijarse a las prótesis valvulares cardíacas o producir infección candidiásica casi en cualquier parte. Después de la administración de antimicrobianos por vía oral con frecuencia ocurre un gran incremento de *Candida* en el intestino y puede penetrar a la circulación a través de la mucosa intestinal. ^[28]

2.1.4 Especie *Candida albicans*

2.1.4.1 Descripción general

Hongo dimorfo que forma largas pseudohifas, hifas y blastoconidios (figura 6). Numerosas clamidosporas unicelulares, redondas u ovaladas, con gruesa pared refringente. Asimilan y fermentan azúcares. Colonias de crecimiento rápido, circulares, lisas, blancas o cremosas, pastosas y blandas, de bordes precisos, centro ligeramente prominente. En la figura 7 se pueden observar colonias de *C. albicans* en agar Sabouraud después de 4 días de incubación a 37°C. ^[11]

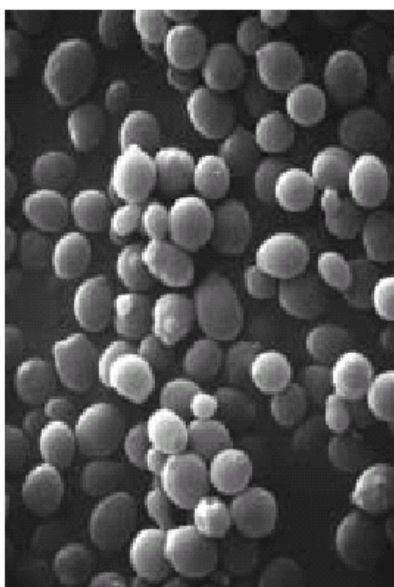


Figura 6. Blastoconidios de *Candida albicans*. ^[11]

GRUPO POLIFENOLES UTP

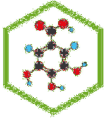


Figura 7. Crecimiento de *Candida albicans* en Sabouraud dextrosa agar. ^[11]

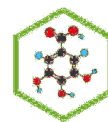
Candida albicans está asociada ecológicamente a seres vivos de sangre caliente. Su temperatura óptima de crecimiento es 37 °C. Los tractos digestivo y respiratorio, junto con la mucosa genital (vagina), son los reservorios más importantes en los seres humanos y origen de candidiasis endógenas. En estas localizaciones se comporta como un saprobio y su aislamiento no implica por sí solo la presencia de infección. ^[11]

2.1.4.2 Morfología

Candida albicans suele presentarse como una célula oval levaduriforme de 2 a 4 micras, con paredes finas; sin embargo, en tejidos infectados también se han identificado formas filamentosas de longitud variable, con extremos redondos de 3 a 5 micras de diámetro y pseudohifas, que son células alargadas de levadura que permanecen unidas entre sí. ^[29]

Microscópicamente, *C. albicans* presenta dimorfismo, el cual es una transformación de la forma ovoide de las blastosporas (levaduras) gemantes a hifas. La composición química de *C. albicans* esta representada por 20 - 40% de

GRUPO POLIFENOLES UTP



proteínas y 30 – 50% de polisacáridos, mientras que la proporción de lípidos es variable. La fracción lipídica va a depender de la cepa, edad del cultivo, condiciones ambientales y del origen de la fuente de carbono. ^[29]

2.1.4.3 Ecología

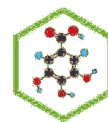
La presencia de *C. albicans* como comensal en las membranas mucosas de sujetos asintomático es común, por lo que en sujetos sanos, existe un balance entre los mecanismos de defensa del hospedador y el potencial invasivo por parte de las levaduras. Sin embargo, cuando el sistema de defensa del hospedador se daña, tal como ocurre en sujetos inmunosuprimidos o médicamente comprometidos, la infección por *C. albicans*, así como por otras especies de *Candida* puede derivar en el establecimiento de una candidiasis la cual se puede manifestar bien sea de manera superficial, involucrando la mucosa bucal, o diseminada, y así constituye una forma invasiva mas seria. ^[29]

C. albicans se puede encontrar en condición facultativamente patógena, desde un estado saprofítico simple, pasando por el comensalismo, hasta la situación de patógeno. Se encuentra libre en la naturaleza donde puede ser aislado. En el ser humano se encuentra como comensal en el tracto respiratorio e intestinal, en la vagina y boca, sobre la piel donde reside con mayor frecuencia entre los pliegues naturales que son sitios relativamente calientes y de mayor humedad. ^[29]

2.1.4.4 Epidemiología

La principal fuente de infección en los humanos es la vía endógena; la piel y las mucosas intactas son la principal barrera defensiva frente a su infección. También es posible la transmisión interhumana a partir de ambientes hospitalarios (infecciones nosocomiales). La importancia del sistema inmune, en especial los linfocitos, condiciona en gran parte las infecciones oportunistas que ocasionan este grupo de hongos. La infección por levaduras se puede presentar después de

GRUPO POLIFENOLES UTP



un tratamiento con antibióticos (especialmente con tetraciclinas) prescritos con otro fin terapéutico. También pueden presentarse en asociación con diabetes o con problemas que afectan al sistema inmune como el SIDA o el virus del VIH. ^[10]

2.1.4.4.1 Infecciones de las mucosas:

Incluyen esofagitis y vaginitis entre las principales; pero también tienen entidad propia la afección de la mucosa del tubo digestivo no esofágica, balanitis, candidiasis cutánea, foliculitis, intertrigo, onicomiosis, candidiasis perianal, etc. ^[30]

2.1.4.4.2 Infecciones de órganos profundos:

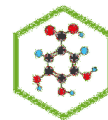
Incluye la candidiasis del sistema nervioso central (SNC), la cardíaca, la urinaria, la respiratoria, la ocular, la candidiasis diseminada. ^[30]

La afección del SNC se suele producir en el contexto de una candidiasis diseminada: puede existir afectación del parénquima cerebral y de las meninges. Las lesiones suelen ser microabscesos y la sintomatología es variable pudiendo manifestarse inicialmente como un coma. En el corazón *C. albicans* puede causar endocarditis, miocarditis y pericarditis. ^[30]

2.1.4.4.3 Vaginitis:

Esta infección es común en mujeres que toman anticonceptivos orales que contienen estrógenos y en mujeres embarazadas. Esto se debe al aumento de los niveles de estrógeno en el organismo. El aumento del nivel hormonal ocasiona cambios en el ambiente vaginal que lo hacen perfecto para el crecimiento y la nutrición del hongo. ^[10] Esto sucede cuando el ambiente en la vagina presenta ciertas condiciones favorables que permiten que la *C. albicans* crezca y se nutra. Un medio ambiente que dificulte la supervivencia de otros microorganismos puede igualmente ocasionar un desequilibrio que conlleva a la infección por levaduras. Los antibióticos cambian el equilibrio normal entre los organismos que habitan la

GRUPO POLIFENOLES UTP



vagina, inhibiendo el crecimiento de las bacterias protectoras que normalmente tienen un efecto antimicótico. ^[10]

2.1.4.5 Cultivo

Las especies de *Candida* crecen bien en medios de cultivo con agar, peptona, dextrosa, maltosa o sacarosa. Las colonias muy pequeñas aparecen en un lapso de 24 a 36 horas y miden de 1,5 a 2 mm de diámetro después de 5 a 7 días. En Agar Sabouraud las colonias son típicamente blancas por completo, pero adquieren un color crema al continuar envejeciendo. ^[29]

En Agar Sabouraud o en otros medios de cultivo similares, las colonias que crecen son lisas, suaves, húmedas y de color y aspecto cremoso; con aspecto de levadura, de consistencia blanda y rápidamente proyectan filamentos hasta la profundidad del agar. ^[29] Las colonias de *Candida* crecen *in vitro* en condiciones de aerobiosis en medios de cultivo a pH con rango entre 2,5 y 7,5 y temperatura que oscila entre 20°C y 38°C. el crecimiento de colonias se puede detectar entre 48 y 72 horas después de la siembra. ^[29]

2.2 Antimicóticos

Existe un numero limitado, pero creciente, de antibióticos que pueden emplearse para tratar las infecciones micóticas. Casi todos tienen una o más limitaciones, como sus efectos adversos intensos, el espectro antimicótico reducido, la escasa penetración a ciertos tejidos y la capacidad de inducir la selección de hongos resistentes. En la actualidad se intentan desarrollar nuevos fármacos prometedores y otros se evalúan en experiencias clínicas. ^[31]

A continuación en la tabla 3 se presentan algunos de los antimicóticos más usados:

GRUPO POLIFENOLES UTP

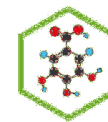
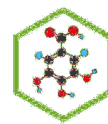


Tabla 3. Características de los antimicóticos más comúnmente usados. ^[31]

Antimicótico	Mecanismo de acción	Forma de administración	Efectos adversos
Anfotericina B	Implica la formación de complejos con el ergosterol en las membranas celulares fúngicas y como resultado hay daño a la membrana y salida del contenido celular.	vía intravenosa	Fiebre, escalofríos, disnea e hipotensión. Con frecuencia también se observan durante la terapia azoemia, hipopotasemia, anemia, acidosis tubular renal, cefalea, náuseas y vómito.
Flucitosina	Una permeasa transporta activamente la flucitosina al interior de las células fúngicas. La enzima citosina la convierte en 5-fluorouracilo y la incorpora en el monofosfato del ácido 5-fluorodesoxiuridílico, que interfiere en la actividad de la timidilato sintetasa y la síntesis del ADN.	vía oral	Su conversión a fluorouracilos genera un compuesto altamente tóxico. La administración prolongada de flucitosina provoca supresión de la médula ósea, pérdida del cabello y anomalía de la función hepática.
Azoles	Bloquean la desmetilación 14- α del lanosterol dependiendo del citocromo P450, precursor del ergosterol en hongos	vía oral	El ketoconazol es el más tóxico y dosis terapéuticas pueden inhibir la síntesis de la testosterona y el cortisol. Todos los azoles antimicóticos pueden causar tanto aumento asintomático de las pruebas funcionales hepáticas como casos raros de hepatitis.

GRUPO POLIFENOLES UTP



2.3 Familia Melastomataceae

Las plantas pertenecientes a la familia Melastomataceae comprenden alrededor de 180 géneros y 4400 especies cuya clasificación según el Takhtajan se presenta en la tabla 4. ^[32]

Tabla 4. Sistema de clasificación de las Melastomatáceas

División	<i>Magnoliopsida</i>
Clase	<i>Rosidea</i>
Orden	<i>Myrtales</i>
Familia	<i>Melastomataceae</i>
Genero	<i>Miconia, Clidemia</i> ; entre otros.

La amplia distribución geográfica de las Melastomataceae le permite tener una gran variedad morfológica y usos. ^[33]

En la tabla 5 se presentan las Principales características morfológicas y usos de la familia Melastomataceae y algunos de sus géneros.

GRUPO POLIFENOLES UTP

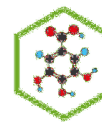


Tabla 5. Características generales de la familia Melastomataceae ^[32] ^[33]

FAMILIA MELASTOMATACEAE		
Descripción general	Crecen en los trópicos del Viejo Mundo, así como en el Nuevo Mundo. No obstante, tres cuartas partes de todas sus especies crecen en los bosques tropicales del Nuevo Mundo. Abundan desde el nivel del mar hasta las cimas de las montañas. Para Colombia se registran aproximadamente 61 géneros, con mayor área de distribución en los andes, Choco biogeográfico y Amazonia. ^[34]	
Morfología	Principalmente arbustos pero también existen árboles, herbáceas y lianas. Las hojas son simples, opuestas, carecen de estipulas, presentan de uno a cuatro partes de nervaduras desde la base, los frutos son bayas pequeñas o capsulas secas.	
Usos	<p>las especies arbóreas son usadas como madera para leña, y unas pocas especies son utilizadas como ornamento en antejardines, aceras y parques. ^[35]</p> <p>Han sido usadas como medicina tradicional, especialmente en Asia y Latinoamérica. En Indonesia malasia y china algunos géneros de esta familia, han sido usadas como remedio para la diarrea, disentería, leucorrea, y varias enfermedades de la piel: como astringente y hemostático.</p> <p>La decocción de los tallos o toda la parte aérea de arthrostroma volubiletriana y A. macro desmungleason. Se utiliza en Colombia, para bajar la fiebre, especialmente en el tratamiento de la malaria. El tallo o la sabia son masticados para disminuir la sequedad o irritación de las encías. La cocción de toda la planta brachyotum strigosum Triana, es usado contra los cálculos en la vejiga y otras enfermedades del trato genitourinario. ^[36] ^[37]</p>	
Algunos géneros y especies	<p><i>Miconia</i>: el género más grande, y uno de los mayores dentro de las angiospermas con alrededor de 1000 especies, distribuidas a lo largo de toda América tropical desde el norte de Argentina hasta el centro-norte de México. ^[38]</p>	<p><i>Miconia caudata</i>: Nombre común: Lanzo Usos: combustible. Ornamental. Maderable. Distribución geográfica: Nativo en América tropical, espontáneo en la zona cafetera del departamento de Caldas entre 800 - 1.800 m.s.n.m. ^[39]</p> <p><i>Miconia</i> sp</p>
	<p><i>Clidemia</i>: un género con alrededor de 450 especies de plantas de flores perteneciente a esta familia. ^[40]</p>	<p><i>Clidemia hirta</i>: Nombre común: cordobán peludo. (Figura 8) Son arbustos de 1-4 m, ramitas, pecíolos, pedúnculos, y cáliz hirsutos con largos pelos rojizos y a menudo con pelos estrellados. ^[40]</p>

GRUPO POLIFENOLES UTP

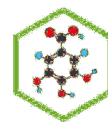


Figura 8. Planta *Miconia* sp.



Figura 9. Hojas de la planta *Clidemia hirta*.^[41]

2.4 Familia Rubiaceae

Rubiaceae es una familia cosmopolita, pero con mayor presencia en las regiones tropicales y subtropicales. Es una de las más diversas al nivel mundial, ya que ocupa el cuarto lugar después de Asteraceae, Orchidaceae y Poaceae, con alrededor de 10.700 especies (Mabberley, 1987). Algunas especies se extienden hacia regiones templadas y aún frías, pero están completamente ausentes en la región ártica. En las regiones templadas predominan especies de hábito herbáceo, en tanto que en los trópicos se hallan preferentemente arbustos y árboles de bajo porte y algunos de ellos gigantes.^[42]

Las principales características morfológicas y algunos de sus usos se presentan a continuación en la tabla 6.

GRUPO POLIFENOLES UTP

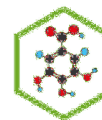


Tabla 6. Características generales de la familia Rubiaceae.

FAMILIA RUBIACEAE	
Morfología	En las regiones templadas predominan especies de hábito herbáceo, en tanto que en los trópicos se hallan preferentemente arbustos y árboles de bajo porte y algunos de ellos gigantes. ^[43] Árboles, arbustos o hierbas a veces espinosas con hojas simples, opuestas o verticiladas, con estipulas hojosas. El fruto es una capsula, baya drupa o esquizocarpo. Las semillas son a veces aladas. ^[43] (figura 10)
Usos	Rubiácea presenta especies con importancia económica ya sea en la producción de tintes, sustancias médicas, productos comestibles o maderables. Merecen mención especial el café, bebida estimulante y tonificante que contiene cafeína y que se obtiene a partir de las semillas tostadas de algunas especies de Coffea. La quinina, rica en alcaloides derivados de la quinoleína y empleada en el tratamiento de la malaria, fibrilación auricular y en la profilaxis de las arritmias cardíacas, se obtiene a partir de la corteza de especies de Cinchona, Remijia y Ladenbergia. La ipecacuana, que es una droga rica en emetina, cafeína y psycotrina y utilizada en bajas dosis como balsámica, astringente, emética, expectorante y antidiarreico, se obtiene de las raíces de Psychotria ipecuacanha. La yohimbina, derivada del indol y que tiene propiedades afrodisíacas, simpaticolíticas e hipotensoras, se obtiene de la corteza de Pausinytalia yohimbe. ^[42]
Algunos géneros y especies	<i>Hamelia patens</i> : Nombre común: Coloradillo, Coralillo. (figura 10) Lugar de origen: Nativo desde Méjico a Bolivia, Paraguay, Brasil e islas del Caribe. Distribución: Sabana de Bogotá: Provincia de Bogotá ^{[20] [21]} Hamelia patens perteneciente a la flora colombiana es considerada una planta medicinal con propiedades analgésicas, antibacterianas antifungicas, antiinflamatorias y diuréticas. Las hojas en cocción o en zumo son usadas como remedio contra la sarna en forma de baños o cataplasmas. ^[20] <i>Alberta</i> E.H.Mey. Árboles o arbustos siempre verdes de hojas opuestas, con anchas estipulas. Flores en panículas terminales. Fruto en drupa con el cáliz persistente. ^[43] Comprende 3-4 especies nativas Sudáfrica.

GRUPO POLIFENOLES UTP

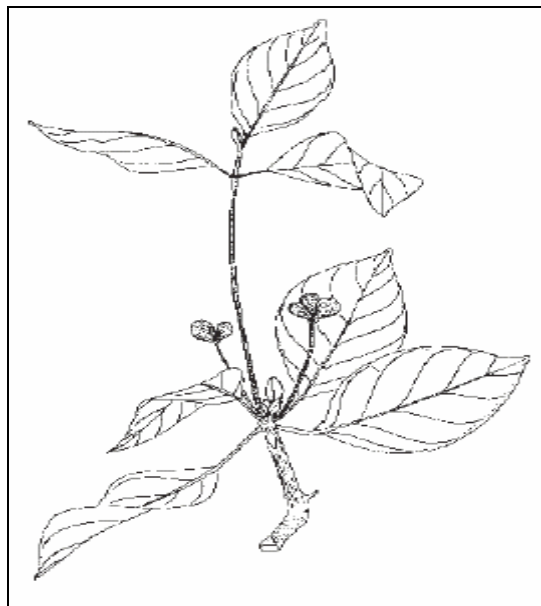
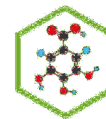


Figura 10. Planta característica de la familia Rubiaceae. ^[42]

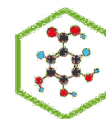


Figura 11. Plata y flor Hamelia patens. ^[20]

2.5 Descripción del Método de Perforación en Placas

Diferentes métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar *in vitro* la susceptibilidad de microorganismos ante diferentes agentes microbianos. En muchos laboratorios de microbiología, el test de difusión en agar es el más usado,

GRUPO POLIFENOLES UTP



pues se han desarrollado estándares para su interpretación, está apoyado por datos clínicos y de laboratorios; y presenta la ventaja que sus resultados son altamente reproducibles. ^[44]

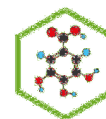
La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer et al., (método de Kirby-Bauer). Este método de difusión en disco fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Sub-comité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de Estados Unidos. ^[44] El fundamento de esta determinación es establecer, en forma cuantitativa o relativamente cuantitativa, el efecto de un conjunto de antibióticos, ensayados individualmente, sobre las cepas microbianas que se aíslan de procesos infecciosos. ^{[44] [45]}

El método se basa en el hecho que existe una relación entre la concentración de antibiótico necesaria para inhibir un microorganismo y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con el microorganismo a ensayar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro impregnado con una cantidad conocida del mismo antibiótico. ^{[45] [46]}

En el caso de evaluar varios antibióticos los discos de papel filtro deben ponerse en forma equidistante. A continuación se procede a su incubación a la temperatura adecuada por 24 horas. Luego con una regla se mide el halo de inhibición y se compara con los halos de los distintos antibióticos sobre el microorganismo estudiado. La lectura de los resultados es bastante simple y su expresión representa en buena forma la actividad *In vitro* del antibiótico a emplear. ^[46]

Es necesario señalar que el tamaño del halo de inhibición es influenciado por varios factores, entre ellos tenemos; medio de cultivo en que se realiza la prueba, estabilidad del antibiótico, capacidad de difusión del antibiótico, cantidad de inóculo, rapidez de desarrollo del microorganismo, sensibilidad al antibiótico, período de incubación. Cualquier variación de estos factores puede afectar el

GRUPO POLIFENOLES UTP



resultado de la prueba, sin embargo, al emplear un procedimiento estándar es posible obtener resultados confiables. ^[45]

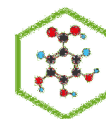
El bioensayo realizado por el método de Kirby-Bauer modificado a perforación en placa para determinar la actividad antimicrobiana, es el ensayo que está realizando el grupo de investigación: POLIFENOLES UTP, de la Universidad Tecnológica de Pereira, el cual se ha centrado en el análisis antimicrobial de extractos, aceites esenciales y compuestos sintéticos, aislados de diferentes plantas. Su metodología es básicamente igual a la ya descrita pero se modifica en la utilización de pozos y no discos de papel en los cuales se deposita el extracto a evaluar.

2.6 Descripción del Método de microdilución

La cuantificación de la actividad *In vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante algunas de las variantes de los métodos de dilución. La Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) se define como la mínima concentración de antimicrobiano (en $\mu\text{g/mL}$) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37°C. La MIC se ha establecido como "*gold Standard*" frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad antimicrobiana; además de confirmar resistencias inusuales, da respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos es indeterminado. ^[47]

Tras la incubación de las cajas se procede a la adición del bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolo. (MTT). Las células vivas y metabólicamente activas son capaces de reducir el MTT, de color amarillo en solución a formazán, compuesto insoluble que precipita en forma de cristales violeta, esta reacción está catalizada por la succinato deshidrogenasa mitocondrial. ^[47]

GRUPO POLIFENOLES UTP



El uso del MTT, es práctico pues el formazán absorbe a una longitud de onda entre 550-570 nm. Lo que se encuentra en el visible y es fácil de detectar.

2.7 Descripción del método de macrodilución

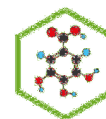
Este método se basa en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar).

Los métodos de dilución se consideran de referencia para la determinación cuantitativa de la actividad de los antimicrobianos. Son los métodos indicados cuando, además de la actividad inhibitoria, se quiere determinar también la actividad bactericida. La gran cantidad de variables (dependientes del microorganismo, del medio de cultivo, del inóculo) que influyen en estos métodos son responsables de oscilaciones en el resultado finalmente obtenido, por lo que para su correcta evaluación es necesario que se realicen de forma estandarizada.

El método de macrodilución es el más ampliamente usado y es el método de referencia para células levaduriformes y es el propuesto por la NCCLS. Este método es adecuado para probar todos los agentes antifúngicos de cualquier aislamiento fúngico. Este método se utiliza en laboratorios en los cuales el volumen de estas pruebas sea bajo. ^[49]

En comparación con los métodos de difusión, los métodos de dilución son técnicamente más complejos y casi siempre más caros. ^[48]

GRUPO POLIFENOLES UTP

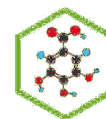


2.8 Selección del material vegetal

La selección del material vegetal se realizó basados en trabajos previos realizados por el grupo de investigación: Polifenoles UTP a una variedad de plantas pertenecientes a la familia *Melastomataceae* y *Rubiaceae*, en los cuales se evaluó la actividad antibacterial y antifúngica de los extractos crudos y sus fracciones, como por ejemplo la evaluación de la actividad antifúngica de la *Miconia coronata* frente a *C. albicans*, la cual proporcionó resultados positivos de dicha actividad y abrió las puertas a mas investigaciones alrededor de esta familia de plantas. ^[49]

De igual manera la identificación de diferentes compuestos químicos con reconocida actividad biológica, como los polifenoles (taninos) comúnmente relacionados como los principales responsables de dicha actividad, identificados por medio de cromatografía y espectrofotometría de masas oriento la selección de estas plantas como objeto de estudio en este trabajo. ^{[30] [36] [51]}

GRUPO POLIFENOLES UTP



3. SECCIÓN EXPERIMENTAL

3.1 Material Vegetal

Se colectaron 4 especies de plantas (Tabla 7); en el Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira, con la ayuda del Coordinador de Investigación del jardín Dorian Ruíz Penagos.

Tabla 7. Resumen de las plantas objeto del estudio de actividad antifúngica.

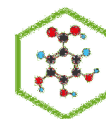
Familia	Especie	Nº Colección	Identificación taxonómica (Herbario Nacional Colombiano)
Melastomataceae	<i>Clidemia hirta</i> (L.) D. Don	520328	O. A. Jara
Melastomataceae	<i>Miconia caudata</i> (Bonpl.)	520329	O. A. Jara
Melastomataceae	<i>Miconia</i> sp	520330	H. Mendoza & O. A. Jara
Rubiaceae	<i>Hamelia patens</i> Jacq.	519788	L. C. Jiménez

3.2 Procedimiento general de extracción del material vegetal.

El material vegetal se sometió a un proceso de secado a 40 °C por 24 h, posteriormente se procedió a moler el material (molino IKA- WERKE).

El material seco y molido se dividió en tres fracciones, cada una se llevo a un proceso de extracción sólido-líquido con diclorometano y ultrasonido por 15 min., se filtró al vacío y se separó el extracto. Al material extraído se le repitió la operación con una nueva mezcla del solvente, por tres veces, esto con el objetivo de separar la mayor cantidad de compuestos apolares del material vegetal.

GRUPO POLIFENOLES UTP



El material restante de la extracción con diclorometano se trato con 30 ml de una solución isopropanol-agua (65:35) extracción sólido-líquido; llevando a ultrasonido (Fisher Scientific FS60H). Este proceso se repitió 4 veces mas, obteniendo un volumen del extracto de aproximadamente 120 ml; el cual fue rotaevaporado en Rota evaporador marca Buchi (R-205) hasta completa sequedad.

El extracto seco obtenido se disolvió en 20 ml de agua y se realizó una extracción líquido-líquido con 5 ml de butanol 4 veces, obteniendo el extracto butanólico y el extracto acuoso.

Los extractos se concentraron en un evaporador rotativo (marca Buchi R-205), llevando a sequedad los extractos. Recuperando así la mayor cantidad de los solventes utilizados en este proceso. ^{[32] [36] [50] [51]}

GRUPO POLIFENOLES UTP

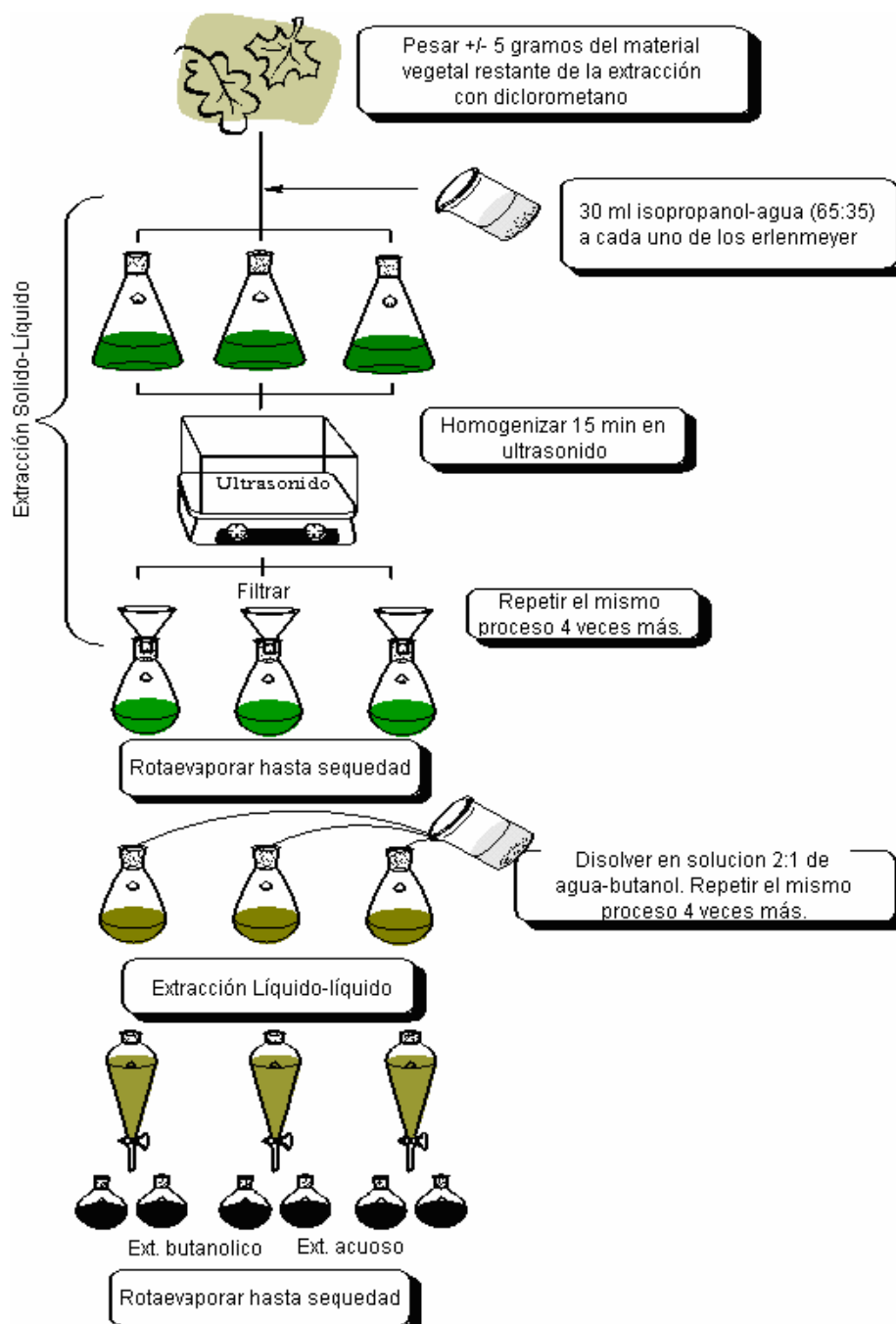
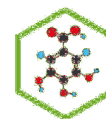
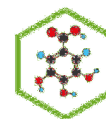


Figura 12. Diagrama de extracción de las fases acuosa y butanólica, de las plantas objeto de estudio.

GRUPO POLIFENOLES UTP



3.3 Cultivo del inóculo

La cepa de *A. niger* (DSM 821) fue replicada en tubo de agar PDA (ver composición anexo 1) e Incubada para su crecimiento a temperatura de 25°C por ocho días, y posteriormente almacenada a una temperatura de 5°C.

La cepa de *C. albicans* (ATCC 10 123) fue sembrada en agar Biggy (ver composición anexo 2) en caja de petri, incubada a 35°C (incubadora WTC binder) y conservada a temperatura de 5°C para ser replicada semanalmente.

En la tabla 8 se indican las condiciones de conservación de los microorganismos evaluados.

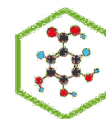
Tabla 8. Condiciones de conservación de los microorganismos evaluados.

Microorganismo	Medio de cultivo	Forma de conservación	Temperatura de incubación	Tiempo de incubación
<i>Aspergillus niger</i> DSM 821	Cultivado en Papa Dextrosa Agar (PDA).	Tubo con agar (PDA) inclinado.	25°C	24 horas
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Cultivada en Biggy o Saboureaud.	Caja de petri con agar (Biggy) inclinado.	35°C	8 días

3.4 Preparación de los antibióticos estándar y muestra problema

Se utilizó como blanco dimetilsulfoxido (DMSO) al 99% y como control se utilizó Micostatin a una concentración de 20000 mg/L para *A. niger* y 5000 mg/L para *C. albicans*, disuelto en agua destilada. Los extractos a evaluar se solubilizarán en DMSO (99%) con agitación en vortex (Vortex marca Mixer Fisher Scientific) a las siguientes concentraciones 100000, 50000, 10000, 5000 y 2500 mg/L (a partir de diluciones sucesivas) para las diferentes especies de plantas a evaluar. Se utilizó dimetilsulfoxido al 99% ya que este permite una mejor conservación, ante la

GRUPO POLIFENOLES UTP



desventaja de la rápida evaporación de solventes como el metanol y etanol; además se agrega que las soluciones en DMSO 99% aportan a la eliminación de la contaminación Bacteriana reduciendo la necesidad de esterilización. ^[1]

3.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA

3.5.1 Método kirby-bauer modificado a perforación en placa

3.5.1.1 Método de Difusión en Agar frente a *C. albicans* ^{[5] [13] [52] [53] [54]}

Junto a un mechero buchner se adicionó en cajas de petri 25 ml de agar Sabouraud al 4% en glucosa, dejando reposar hasta solidificación; con ayuda de una pipeta pasteur se perforó la placa, haciendo 5 pozos que fueron sellados posteriormente con 10µl de agar líquido. Los pozos fueron distribuidos así: un blanco, un control y tres diferentes concentraciones a utilizar de los extractos.

La cepa de Candida, fue cultivada en Sabouraud 0.5 %, a 37 °C por 24 horas. Se lleva a una absorbancia de 0.1, $\lambda = 495$ nm (Para garantizar la misma concentración del inóculo en los diferentes análisis).

A continuación se adiciona 100 µl del inóculo de *C. albicans*, y perlas de dispersión en las cajas de petri, se agita vigorosamente proporcionando una siembra en césped. Cuidadosamente se deben sacar las perlas de dispersión. En cada pozo se adicionaron 10 µl de las soluciones como lo son: el extracto a evaluar, dimetilsulfoxido (DMSO al 99%) utilizado como blanco y Micostatin a una concentración de 5000 mg/l como control positivo; posteriormente se dejaron reposar las cajas en la nevera por media hora para permitir la difusión del extracto. Todas las pruebas para cada extracto fueron realizadas por triplicado.

Finalmente se realizó la lectura del halo de inhibición para cada muestra, el control y el blanco, midiendo el diámetro en milímetros.

GRUPO POLIFENOLES UTP

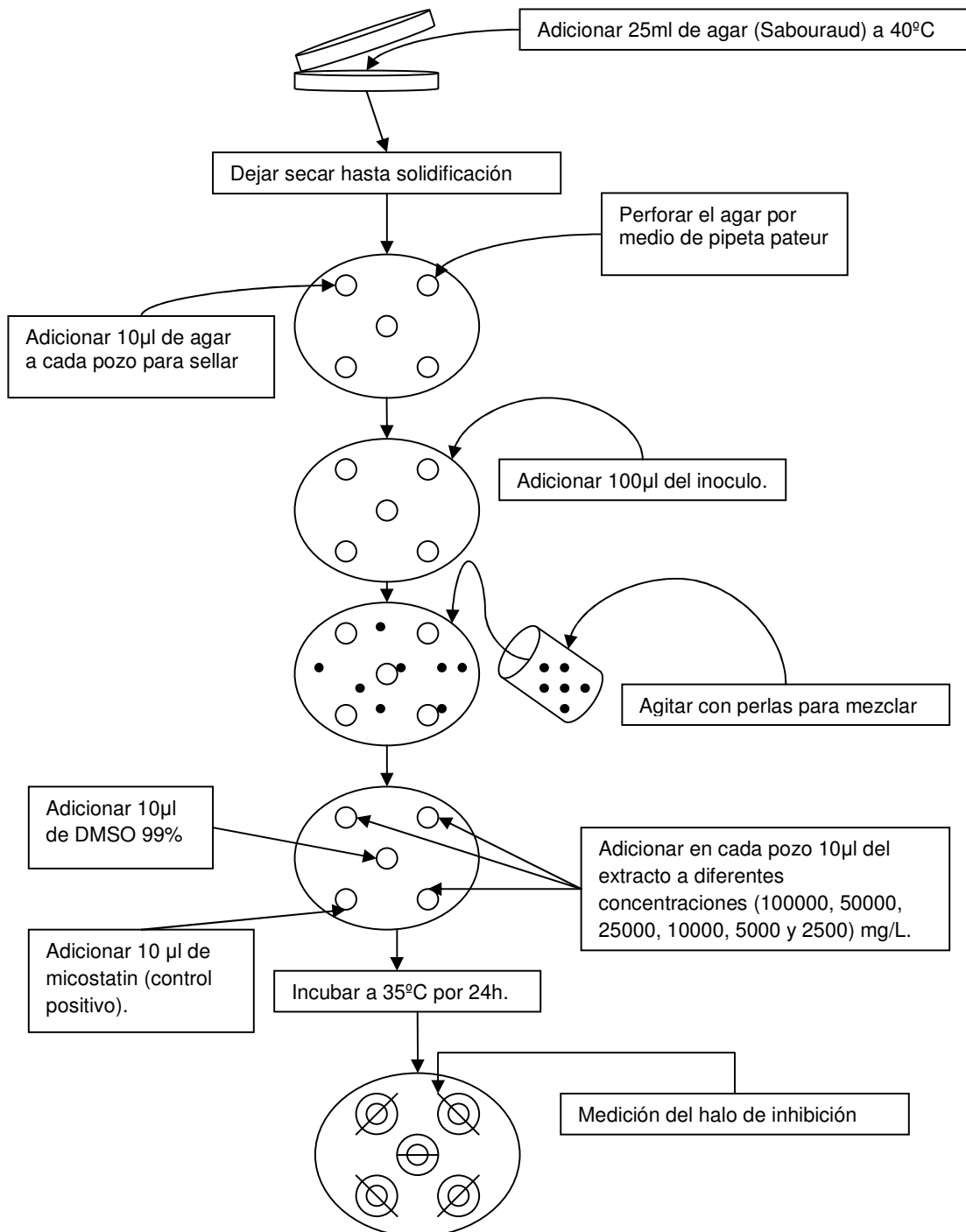
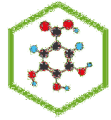
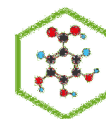


Figura 13. Diagrama de la evaluación actividad antifúngica por difusión para *C. albicans*.

GRUPO POLIFENOLES UTP



3.5.1.2 Método de Difusión en Agar frente a *A. niger*.

El ensayo se realizó por el método kirby – Bauer modificado a perforación en placas de agar para determinar la actividad antifúngica de los extractos. [7] [55] [56]

Junto a mechero buchner se adicionó en caja de petri 1ml de inóculo (solución de esporas suspendidas en una solución salina 0,1% NaCl) previamente contado en hemocitómetro hasta obtener 500000 células/ml; seguidamente se adicionaron 25ml de agar PDA a 40°C y se mezcla por agitación, se dejó reposar hasta solidificación del agar; con la ayuda de una pipeta Pasteur se perforó el agar con cinco pozos, distribuidos así : un blanco, un control (micostatin 20000 mg/l) y las diferentes concentraciones a utilizar de cada uno de los extractos, en cada pozo fueron adicionados 10µl de cada una de las sustancias indicadas y posteriormente se dejaron en la nevera por 1 hora para permitir la difusión del extracto. [57]

Posteriormente se incubaron las cajas a temperatura ambiente por 8 días. Todas las pruebas a cada concentración se realizaron por triplicado.

A continuación se hizo la lectura del halo de inhibición para cada muestra, el control y el antifúngico estándar, midiendo el diámetro en milímetros.

Todo el material de vidrio debe estar limpio y previamente esterilizado (autoclave all american electric pressure steam sterilizer. Model N° 25X) así como trabajar con la mayor asepsia y siempre frente a un mechero.

GRUPO POLIFENOLES UTP

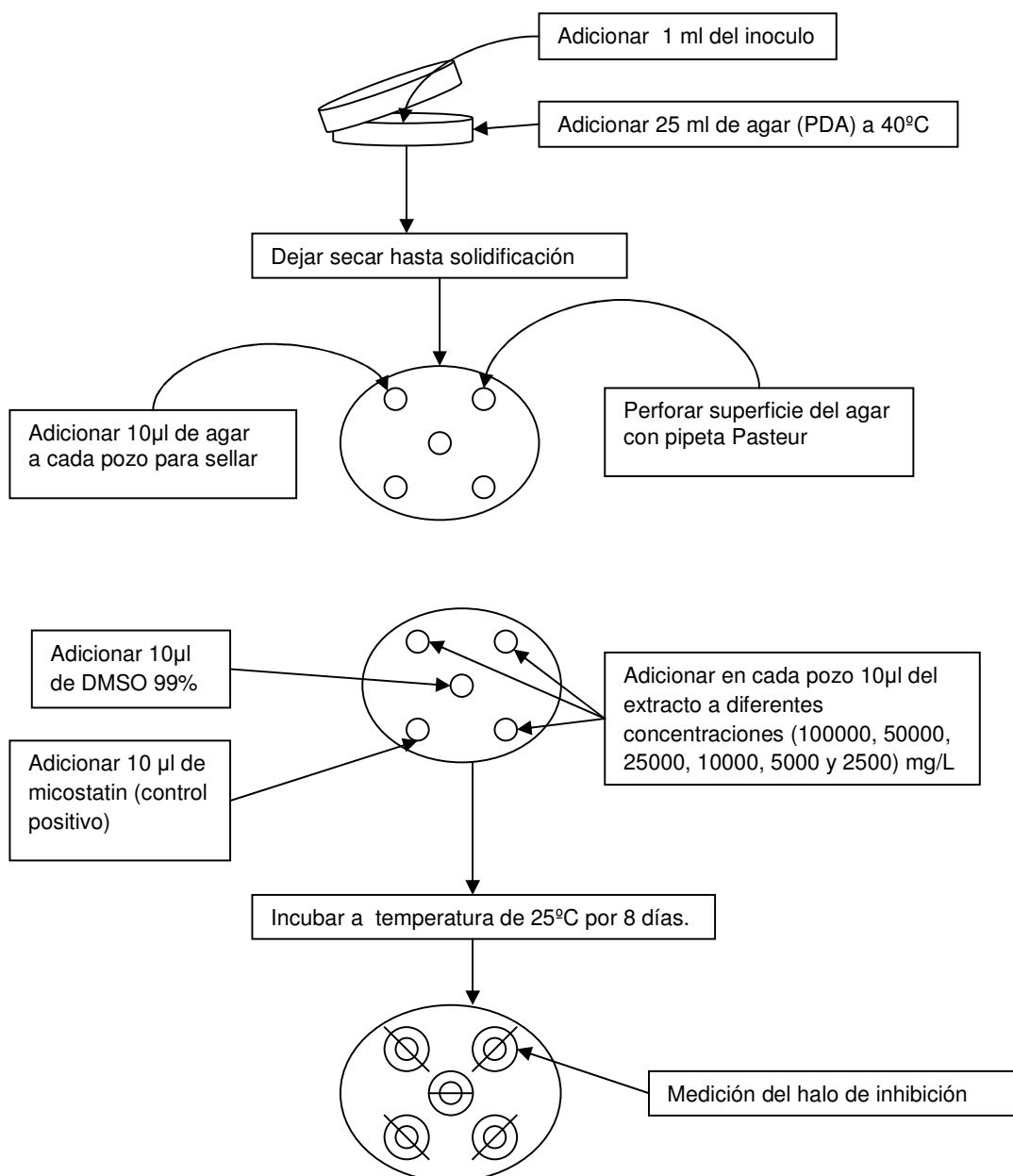
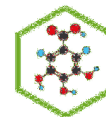
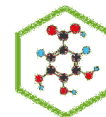


Figura 14. Diagrama de evaluación actividad antifúngica por difusión para *Aspergillus niger*.

GRUPO POLIFENOLES UTP



El porcentaje de inhibición será calculado de acuerdo a la siguiente formula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Promedio inhibición extracto (mm)}}{\text{Promedio inhibición control (mm)}} \times 100\%$$

3.5.2 Método de microdilución en caldo.

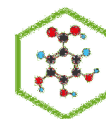
Para las pruebas de actividad antimicrobiana por el método de microdilución se utilizaron microplacas de 96 pozos, cada una con una capacidad de 300 μ l; se preparó una solución stock de 250 g/L del extracto en DMSO, a partir de la cual se prepararon dos diluciones de 125 y 62.5 g/L con DMSO al 99%; obteniendo a partir de estas tres soluciones del extracto en cada pozo una concentración final de 20, 10 y 5 g/L. El blanco utilizado fue DMSO. ^{[47] [58]}

Se transfirió a cada pozo 220 μ l de medio de cultivo líquido y 10 μ l de microorganismo a una absorbancia de 0.1 λ = 495 nm, posteriormente se adicionó de las diluciones de los extractos previamente preparadas 20 μ l a los pozos por triplicado, mas 10 μ l de DMSO al 99% utilizado como control de crecimiento y un control positivo (micostatina a 5000 mg/L).

La lectura inicial se hizo a contra luz observando turbidez o transparencia, después de 4 h de incubación a 37°C, se toma como valor de la mínima concentración inhibitoria (MIC) la concentración del primer pozo que presente transparencia en cada fila.

Posteriormente se realizó la adición de 25 μ l de bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazoilo (MTT) utilizando como medio dispersante TRITON ó

GRUPO POLIFENOLES UTP



TWEEN 80 (0.1 g/ml), a cada uno de los pozos con microorganismos y se incubó a 37°C durante 4 h, permitiendo a las células vivas metabolizar el MTT a formazán.

La segunda lectura se hizo de forma visual, observando la presencia o ausencia de color, ya que la enzima mitocondrial succinato deshidrogenada puede reducir el MTT soluble y amarillo, convirtiéndolo en un producto de color azul intenso e insoluble (MTT formazán).

Cada extracto a las diferentes concentraciones estudiadas fue analizado por triplicado siguiendo el diagrama de la figura 15.

Como prueba confirmatoria se procedió a hacer una siembra por superficie en caja de petri con agar nutritivo, adicionando 20 µl del contenido del pozo e incubándolo por 24 h a 37 °C; para posteriormente realizar la lectura (Inhibición o crecimiento). ^[59]

GRUPO POLIFENOLES UTP

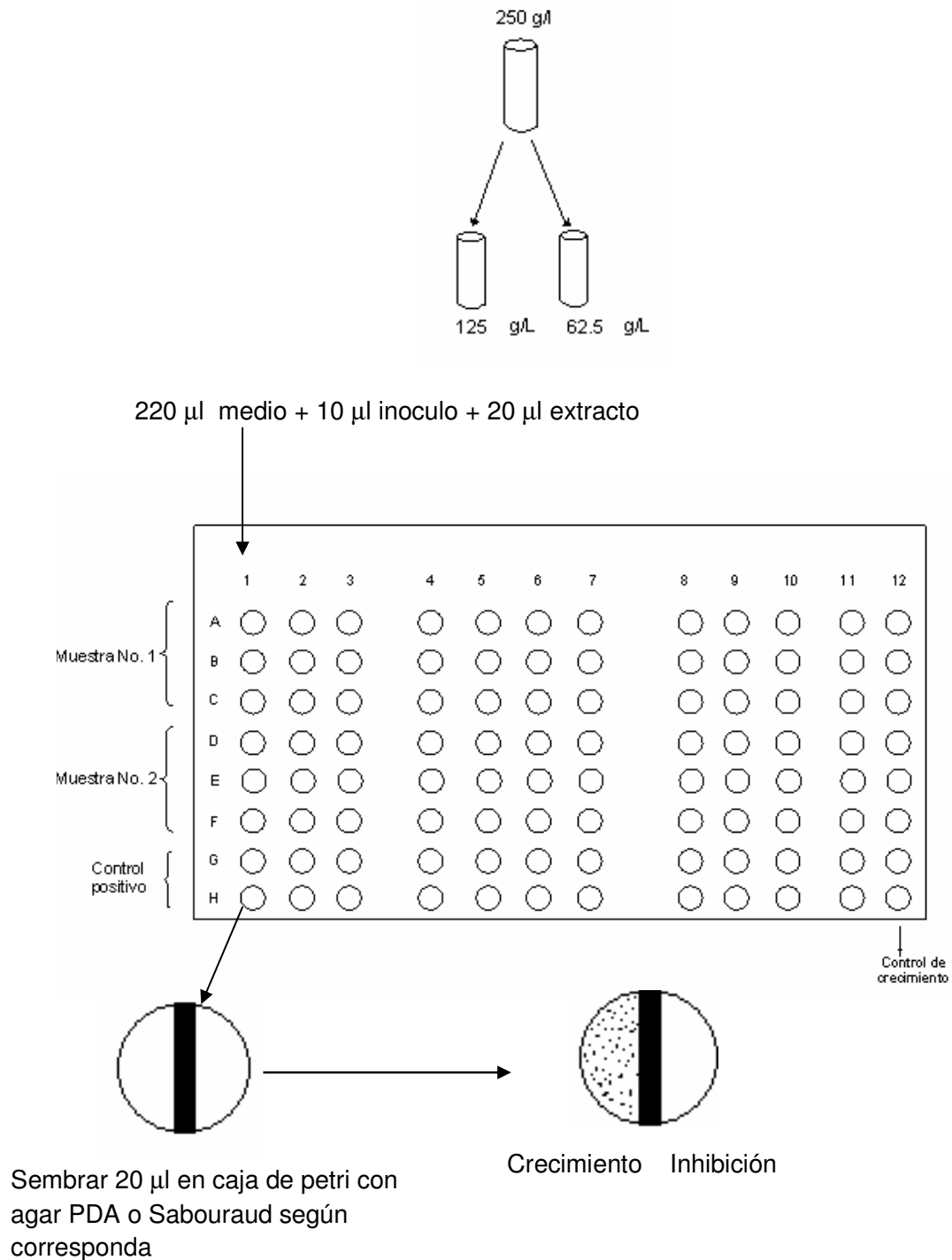
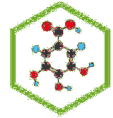
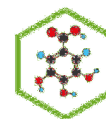


Figura 15. Diagrama de evaluación antifúngica, método de microdilución en caja de 96 pozos.

GRUPO POLIFENOLES UTP



3.5.3 Método de macrodilución en caldo

El análisis por macrodilución en caldo fue realizado para los extractos a concentraciones del 1%, 3%, 5% m/v preparados a partir de una solución del extracto al 25% (250 g/L) diluidos en el medio de cultivo (caldo Sabouraud) para ambos microorganismos, se adicionan 80 µl del inóculo para un volumen total de 2 ml en cada tubo. (V (µl) del medio + V (µl) extracto + V (µl) inóculo).^[60]

Se trabajó con un inóculo para *C. albicans* correspondiente a una solución en caldo con 0.1 de absorbancia y para *A. niger* se trabajo con una solución salina de hongo al 0.05 % m/v.

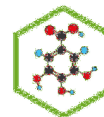
Para análisis contra *A. niger* los tubos fueron incubados por 5 días a una temperatura de 25°C, y contra *C. albicans* los tubos fueron incubados por 24 horas a 37°C, con agitación frecuente en ambos casos.

Se utilizo un control de crecimiento para cada microorganismo con DMSO al 3% en la solución final y 80 µl del inóculo y un control positivo con nistatina (micostatina) al 2% m/v para *C. albicans* y *A. niger*.

Pasado el periodo de incubación 50 µl del contenido de cada tubo fue sembrado por superficie en cajas de petri con agar PDA y Sabouraud respectivamente, homogenizando con rastrillo estéril o perlas, y fueron incubados durante el mismo periodo de los tubos.^{[61] [62]}

Cada extracto fue realizado por triplicado a las tres concentraciones expuestas y frente a los dos microorganismos.

GRUPO POLIFENOLES UTP



Se realizó la lectura de las cajas determinando la inhibición a partir de la presencia o ausencia de crecimiento en estas.^{[63] [64]}

Observar diagrama en la figura 16.

El porcentaje de inhibición fue determinado tras el recuento de las cajas siguiendo la formula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\# \text{ de colonias con el extracto}}{\# \text{ de colonias control de crecimiento}} \times 100\%$$

GRUPO POLIFENOLES UTP

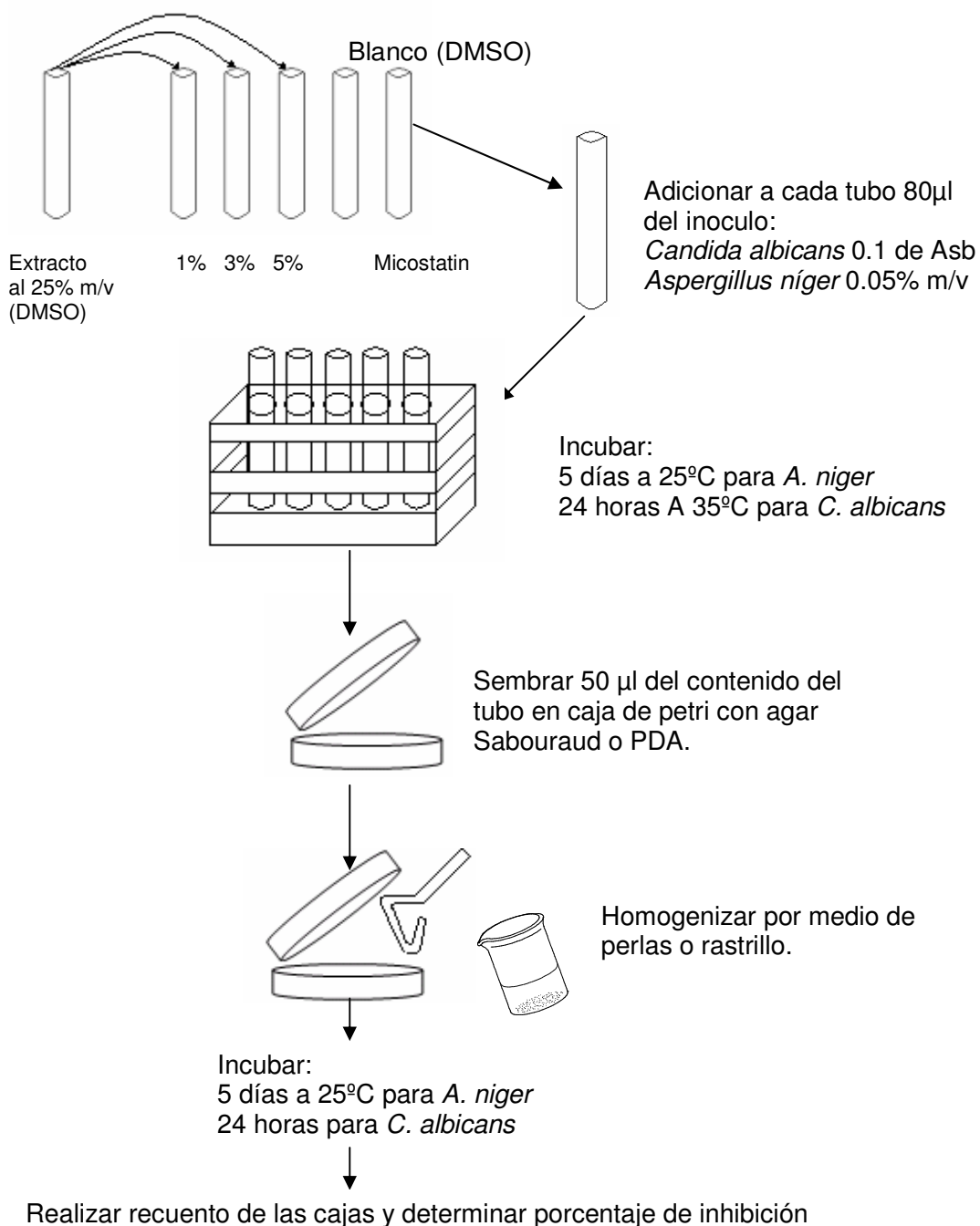
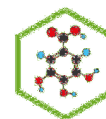
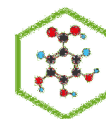


Figura16. Diagrama de evaluación actividad antifúngica, método macrodilución.

GRUPO POLIFENOLES UTP



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Evaluación de la actividad antifúngica

Se realizó la evaluación de la actividad antifúngica de los extractos crudos de las plantas *Miconia caudata*, *Miconia sp*, *Clidemia hirta* pertenecientes a la familia Melastomataceae y *Hamelia patens* perteneciente a la familia Rubiaceae, en fase acuosa y butanólica a concentraciones de 10000, 5000 y 2500 mg/l por el método de difusión en agar; frente al hongos *A niger* a una concentración de 5×10^5 esporas/ml en solución salina al 0,1% y la levadura *C. albicans* a 0,1 de absorbancia, leída a una longitud de onda de 495 nm. Los resultados de este análisis se presentan en las tablas 9 y 10 a continuación.

GRUPO POLIFENOLES UTP

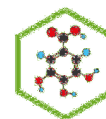


Tabla 9. Resultados de la actividad antifúngica de extractos en fase acuosa por el método de difusión en agar.

Extractos evaluados		Actividad Antifúngica, método de difusión en agar		
		Concentración (mg/L)	<i>Aspergillus niger</i> DSM 821	<i>Candida albicans</i> ATCC10231
Extracto acuoso	<i>Miconia caudata</i>	100000	-	-
		50000	-	-
		25000	-	-
		10000	-	-
		5000	-	-
		2500	-	-
	<i>Miconia sp</i>	100000	-	-
		50000	-	-
		25000	-	-
		10000	-	-
		5000	-	-
		2500	-	-
	<i>Clidemia hirta</i>	100000	-	-
		50000	-	-
		25000	-	-
		10000	-	-
		5000	-	-
		2500	-	-
	<i>Hamelia patens</i>	100000	-	-
		50000	-	-
		25000	-	-
		10000	-	-
		5000	-	-
		2500	-	-

+ = Inhibición del hongo (Act. antifúngica positiva) - = Actividad antifúngica negativa

GRUPO POLIFENOLES UTP

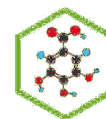
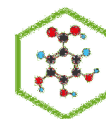


Tabla 10. Resultados de la actividad antifúngica de extractos en fase butanolica por el método de difusión en agar.

Extractos evaluados		Actividad Antifúngica, método de difusión en agar		
		Concentración (mg/L)	<i>Aspergillus niger</i> DSM 821	<i>Candida albicans</i> ATCC10231
Extracto acuoso	<i>Miconia caudata</i>	100000	-	-
		50000	-	-
		25000	-	-
		10000	-	-
		5000	-	-
		2500	-	-
	<i>Miconia sp</i>	100000	-	-
		50000	-	-
		25000	-	-
		10000	-	-
		5000	-	-
		2500	-	-
	<i>Clidemia hirta</i>	100000	-	-
		50000	-	-
		25000	-	-
		10000	-	-
		5000	-	-
		2500	-	-
	<i>Hamelia patens</i>	100000	-	-
		50000	-	-
		25000	-	-
		10000	-	-
		5000	-	-
		2500	-	-

+ = Inhibición del hongo (Act. antifúngica positiva) - = Actividad antifúngica negativa

GRUPO POLIFENOLES UTP



A través de este análisis no se observaron halos de inhibición del crecimiento por parte de los extractos evaluados, comparables con los halos obtenidos con el control positivo (Micostatin), justificando la ausencia de inhibición del crecimiento fúngico en una resistencia expuesta por parte de los microorganismos evaluados por las bajas concentraciones de los extractos evaluados; se considero entonces aumentar la concentración de trabajo de los extractos a 100000 mg/L, 50000 mg/L y 25000 mg/L y realizar un segundo análisis por este método, siguiendo el mismo procedimiento planteado anteriormente y bajo las mismas condiciones en cuanto el tamaño del inóculo; temperatura y tiempo de incubación, para ambas especies de hongos.

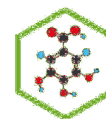
La evaluación de los extractos a concentraciones de 100000, 50000 y 25000 mg/L por difusión en agar no indicó inhibición del crecimiento fúngico observable por el desarrollo de halos de inhibición comparables con los del control positivo.

Estos resultados negativos de inhibición conllevan a reafirman el desarrollo de resistencia fúngica y traen además a consideración una posible no difusión de los extractos en el medio de cultivo que impediría la interacción de estos con el microorganismo a evaluar.

Esta técnica no es considerada apropiada para el análisis de muestras no polares puesto que estas no se difunden fácilmente en el agar. En general el potencial antimicrobiano de diferentes muestras no siempre puede ser comparado, debido principalmente a las diferencias en las propiedades físicas, como la solubilidad, volatilidad y características de difusión del agar. ^[1]

Buscando mejorar la difusión de los extractos y por tanto la acción de estos frente a los hongos se realiza un tercer análisis a través del método de micro dilución en caja de 96 pozos con la utilización del MTT para determinar la presencia o ausencia de crecimiento en cada pozo.

GRUPO POLIFENOLES UTP



Este análisis no permitió llegar a un resultado confiable y certero ya que el crecimiento del microorganismo en estas condiciones se dio bastante lento necesitando por ejemplo para *C. albicans* mas de 24 horas de crecimiento antes de la adición del MTT para poder observar una turbidez considerable de crecimiento. Adicional a esto tras la adición del MTT la reacción colorimetrica del MTT con el microorganismo evaluado fue bastante lenta y en algunos casos nula, lo cual llevó a la reacción del MTT con la luz en todos los pozos, aun el los cuales no había presencia de microorganismo.

El crecimiento del hongo se confirmo a través de la siembra de 20µl del contenido del pozo en cajas de petri con agar Sabouraud; lo cual permite verificar la presencia o ausencia del microorganismo en cada pozo que haya contenido el extracto o el control positivo.

Dada la reacción colorimetrica en todos los pozos, se procedió a realizar las pruebas confirmatorias anteriormente expuesta, sembrando 20 µl del contenido del control positivo y el control de crecimiento dejando incubar por un periodo de 24 horas a 35°C para *C. albicans*, por ejemplo; y observando el crecimiento desarrollado en la caja. Observar Figura 17.

GRUPO POLIFENOLES UTP

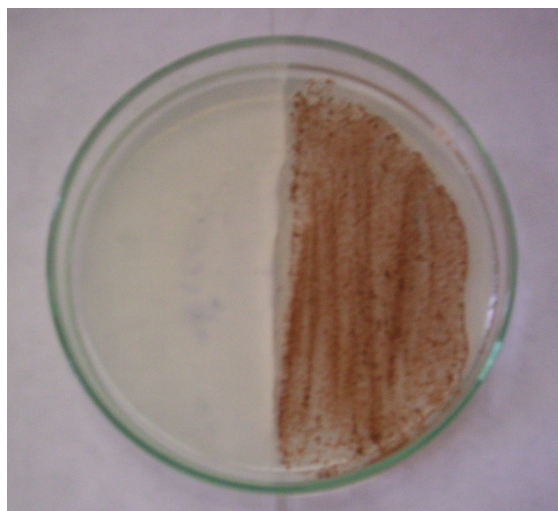
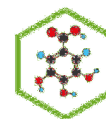
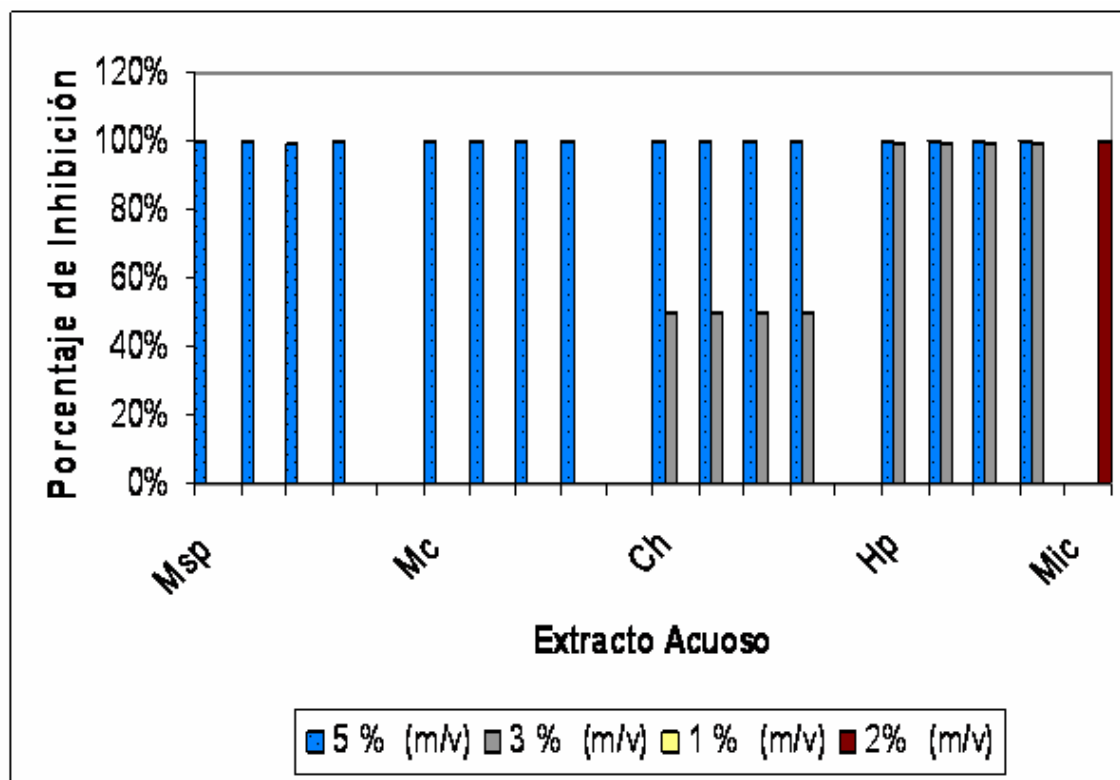
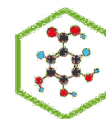


Figura 17. Prueba confirmatoria, ensayo de microdilución.

Ante las inconsistencias presentadas en el análisis realizado por microdilución, como ultima prueba se realizó un ensayo por el método de macrodilución en caldo evaluando los extractos a concentraciones del 5%, 3%, 1% m/v; y los inóculos para *A. niger* a 0.005% m/v y para *C. albicans* al 0.1 de absorbancia.

Este análisis arrojó resultados negativos de la actividad antifúngica de los extractos en fase acuosa y butanólica contra *A. niger*; por otro lado, contra *C. albicans* algunos de los extractos presentaron inhibición del crecimiento hasta en un 100%.

GRUPO POLIFENOLES UTP

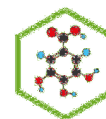


Msp: *Miconia sp*; Mc: *Miconia caudata*; Ch: *Clidemia hirta*; Hp: *Hamelia patens*; Mic: micostatin.

Figura 18. Actividad antifúngica de los extractos en fase acuosa contra el hongo *Candida albicans*, por el método de macrodilución en caldo.

La figura 18 permite observar la presencia de Actividad antifúngica de los extractos en fase acuosa de *Miconia sp*, *Miconia caudata*, *Clidemia hirta* y *Hamelia patens* frente a *C. albicans*; para los cuales se determinó dicha actividad mediante pruebas confirmatorias por siembra en cajas de petri con agar Sabouraud tras 24 horas de incubación a 35°C, pues dado el color oscuro y opaco de los extractos no fue posible la lectura a través de espectrofotómetro de la turbiedad que indica el crecimiento en este tipo de análisis. La susceptibilidad de *C. albicans* a los extractos de *Miconia sp* y *Miconia Caudata* es observable solo a altas concentraciones como el 5% m/v, en la cual se presentó una inhibición del

GRUPO POLIFENOLES UTP



100% del crecimiento microbiano (figura 19) en comparación con el control positivo y el control de crecimiento. Por otro lado, para extractos como el de *Hamelia patens* la susceptibilidad puede presentarse a concentraciones mas bajas como del 3% y en el caso especial de *Clidemia hirta* (figura 20) presenta susceptibilidad dependiente de la dosis pues la inhibición del crecimiento disminuye a la vez que disminuye la concentración del extracto. (Tabla Anexo 1).

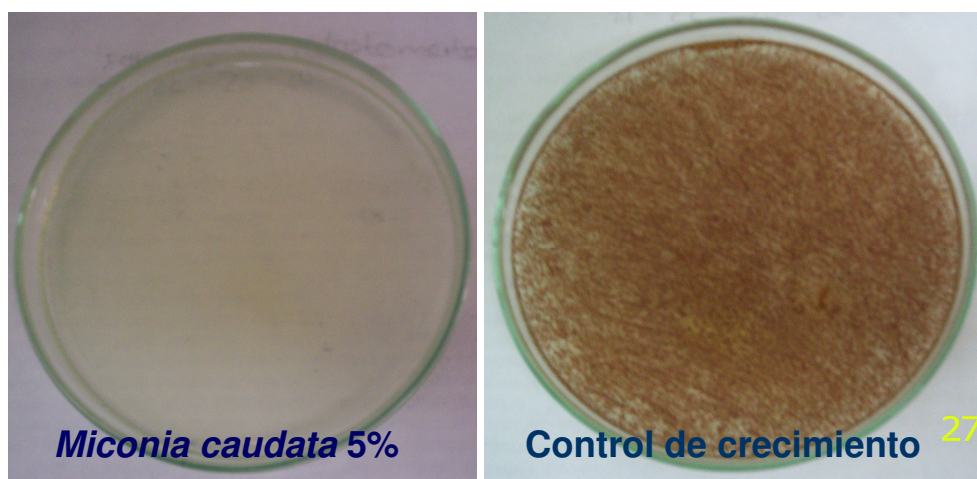
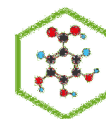


Figura 19. Actividad antifúngica del extracto acuoso de *Miconia caudata* frente a *C. albicans*.



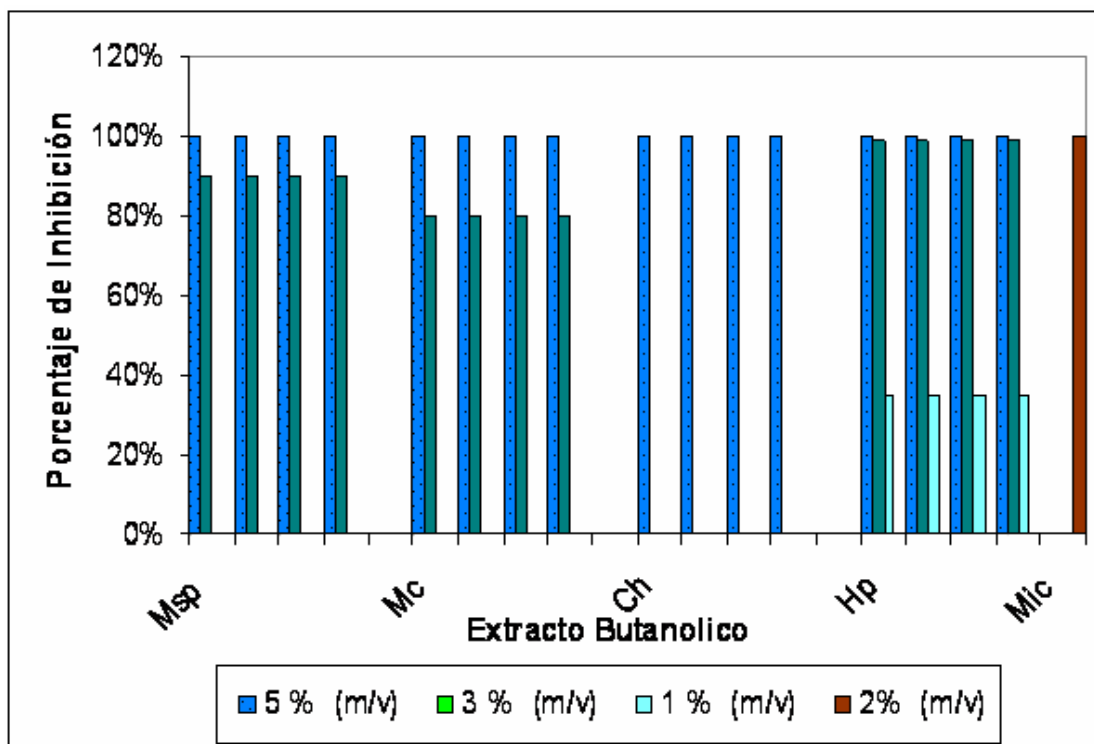
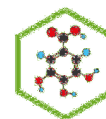
Figura 20. Actividad antifúngica del extracto en fase acuosa de *Clidemia hirta* frente a *C. albicans*.

GRUPO POLIFENOLES UTP



La Actividad antifúngica de los extractos butanolicos contra *C. albicans*, por el método de macrodilución en caldo (figura 21) es mucho mas promisorio que la de los extractos en fase acuosa, este análisis permite establecer que: *Miconia* sp (3 y 5) %, *Miconia caudata* (3 y 5) %, *Clidemia hirta* 5% y *Hamelia patens* (1, 3 y 5) % butanolicos presentan actividad antifúngica contra *C. albicans*, y de igual manera se establece una relación de susceptividad antifúngica dependiente de la dosis suministrada del extracto, bajo la cual a mayor concentración del extracto mayor será la inhibición del crecimiento. El crecimiento de *C. albicans* en las diferentes cajas de agar pasada la exposición al extracto es en algunos casos nulo, mientras en otro a pesar de ser visualmente perceptible la disminución en el crecimiento, son aún incontables el numero de colonias presentes, (Ver figura 22); por lo cual el porcentaje de inhibición presentado es un estimativo próximo al valor real, tras el recuento de las cajas. (Tabla anexo 2)

GRUPO POLIFENOLES UTP



Msp: Miconia sp; Mc: Miconia caudata; Ch: Clidemia hirta; Hp: Hamelia patens; Mic:

Figura 21. Actividad antifúngica de los extractos butanólicos contra el hongo *Candida albicans*, por el método de macrodilución en caldo.

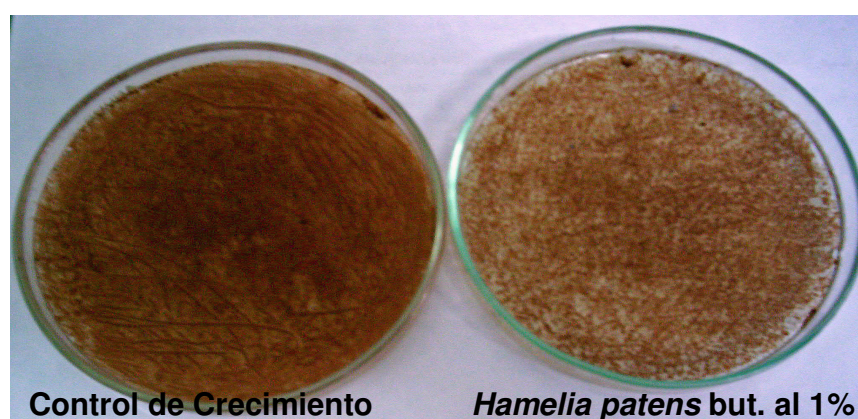


Figura 22. Comparación de crecimiento frente al extracto *Hamelia patens* butanólico.

GRUPO POLIFENOLES UTP

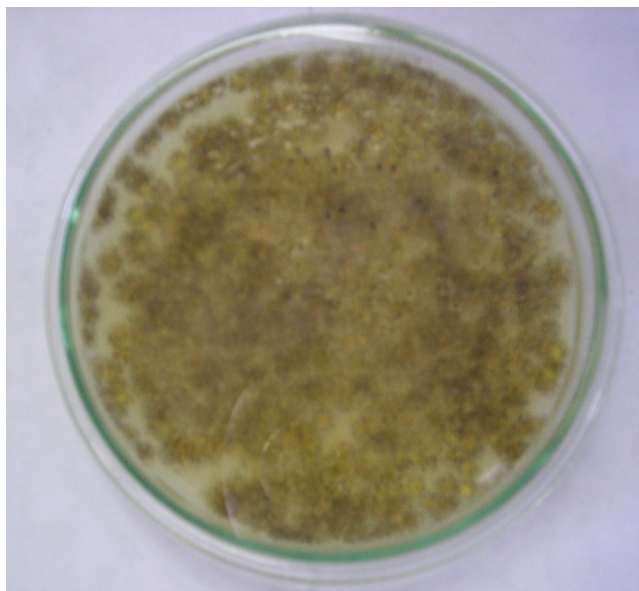
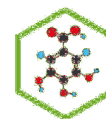
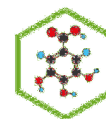


Figura 23. Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos acuosos y butanolicos frente *A. niger*.

La figura 23 muestra el crecimiento de *A. niger* tras la exposición de este a los extractos evaluados en fase acuosa y butanolica a concentraciones del 1%, 3%, 5%; los cuales no inhibieron el crecimiento de este microorganismo bajo ninguna de las técnicas empleadas para la evaluación de la actividad antifúngica, lo cual deja ver claramente la alta resistencia de *A. niger* a estos extractos.

GRUPO POLIFENOLES UTP



CONCLUSIONES

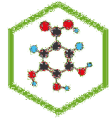
Por medio de las pruebas de actividad antifúngica realizadas por los métodos anteriormente propuestos a tres diferentes especies de melastomataceas y una especie de rubiaceas se puede concluir que los extractos en fase acuosa *Miconia sp* 5%, *Miconia caudata* 5%, *Clidemia hirta* (3 y 5) % y *Hamelia patens* (3 y 5) % y los extractos butanolicos *Miconia sp* (3 y 5) %, *Miconia caudata* (3 y 5) %, *Clidemia hirta* 5% y *Hamelia patens* (1, 3 y 5) % poseen una potente actividad antifúngica comparada con Micostatin al 2% contra *Candida albicans*.

Se puede concluir además que el hongo *Aspergillus niger* no es sensible a los compuestos con actividad biológica presentes en los extractos evaluados.

Diversos estudios realizados por el grupo de investigación: Polifenoles UTP [29] [33] [48] [49] han permitido detectar la presencia de grupos polifenolicos como: taninos hidrolizables, que son esterres de ácido gálico de glucosa y otros azúcares; y fenilpropanoides, como la lignina, flavonoides y taninos condensados. Los cuales han presentado actividad biológica frente a diversos microorganismos; por esto puede ser atribuida la actividad antifúngica de los extractos aquí evaluados a la presencia de compuestos de tipo fenolico.

Se considera el método de perforación en placas de agar un procedimiento poco confiable para la determinación de actividad antifúngica de extractos crudos, dada la poca difusión de estos a través del medio llevando a falsos resultados. A pesar de ser uno de los métodos mas ampliamente utilizados para la determinación de actividad antimicrobial, por lo cual podrían ser errónea la metodología utilizada en el laboratorio.

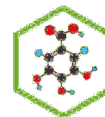
GRUPO POLIFENOLES UTP



El método de macrodilución en placas mostró a través de este trabajo ser mucho mas confiable para el análisis de actividad antifúngica ya que permite un mayor contacto entre el microorganismo y el extracto, proporcionando por tanto mas efectividad en la determinación.

El método de microdilución en caja de 96 pozos es poco recomendado para el análisis de actividad antifúngica de extractos crudos por: el lento crecimiento de los hongos, la reacción colorimetrica del caldo Sabouraud con el MTT y la coloración de los extractos lo cual imposibilita la lectura fotométrica de la turbiedad debida al crecimiento microbiano. Por otro lado la técnica de macrodilución en caldo es poco utilizada por su alto costo, ya que requiere de una mayor cantidad de extracto pocas veces asequible; pero por medio de su prueba confirmatoria en placas permite la determinación de poder fungicida o fungistático.

GRUPO POLIFENOLES UTP

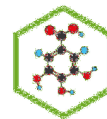


RECOMENDACIONES

Se recomienda el estudio de la actividad antifúngica de estos extractos a través del método de difusión en agar variando las condiciones tales como: medio de cultivo utilizado, solventes utilizados, periodos de incubación, y concentración del inóculo.

Se recomienda el fraccionamiento de los extractos cuya actividad antifúngica fue positiva, seguido por un bioensayo y un proceso de purificación que permita obtener un compuesto puro con actividad antifúngica contra *Candida albicans*.

GRUPO POLIFENOLES UTP



ANEXOS

Anexo 1. Composición del agar PDA

Infusión de Papa 4.0 g/l

Dextrosa 20.0 g/l

Agar Bacteriológico 15.0 g/l

pH 5.6 ± 0.2

Anexo 2. Composición de agar Biggy

Citrato de Amonio y Bismuto 5.0 g/l

Glicina 10.0 g/l

Sulfito de Sodio 3.0 g/l

Extracto de Levadura 1.0 g/l

Dextrosa 10.0 g/l

Agar Bacteriológico 16.0 g/l

pH 6.8 ± 0.2

Anexo 3. Composición de agar Sabouraud

Dextrosa 40.0 g/l

Peptona de Caseína 5.0 g/l

Digerido Pancreático de Tejido Animal 5.0 g/l

Agar Bacteriológico 15.0 g/l

pH 5.6 ± 0.2

GRUPO POLIFENOLES UTP

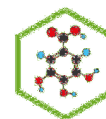


Tabla Anexo 1. Porcentaje de inhibición de los extractos acuosos contra *Candida albicans*; método de dilución en caldo.

EXTRACTO Acuoso	5 % (m/v)	3 % (m/v)	1 % (m/v)	DMSO 99 %	Micostatin 2 %
<i>Miconia sp</i>	100 %	0 %	0 %	0 %	99,9 %
	99,8 %	0 %	0 %	0 %	99,9 %
	99,3 %	0 %	0 %	0 %	99,9 %
(PROMEDIO)	99,7 %	0 %	0 %	0 %	99,9 %
<i>Miconia caudata</i>	99,9 %	0 %	0 %	0 %	99,9 %
	99,9 %	0 %	0 %	0 %	99,9 %
	99,9 %	0 %	0 %	0 %	99,9 %
(PROMEDIO)	99,9 %	0 %	0 %	0 %	99,9 %
<i>Clidemia hirta</i>	99,9 %	50 %	0 %	0 %	99,9 %
	99,9 %	50 %	0 %	0 %	99,9 %
	99,9 %	50 %	0 %	0 %	99,9 %
(PROMEDIO)	99,9 %	50 %	0 %	0 %	99,9 %
<i>Hamelia patens</i>	99,9 %	99 %	0 %	0 %	99,9 %
	99,9 %	99 %	0 %	0 %	99,9 %
	99,9 %	99 %	0 %	0 %	99,9 %
(PROMEDIO)	99,9 %	99 %	0 %	0 %	99,9 %

GRUPO POLIFENOLES UTP

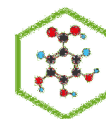
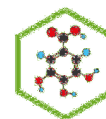


Tabla Anexo 2. Porcentaje de inhibición de los extractos butanolicos contra *Candida albicans*; método de dilución en caldo.

EXTRACTO Butanólico	5 % (m/v)	3 % (m/v)	1 % (m/v)	DMSO 99 %	Micostatin 2 %
<i>Miconia sp</i>	100 %	90 %	0 %	0 %	99,9 %
	100 %	90 %	0 %	0 %	99,9 %
	100 %	90 %	0 %	0 %	99,9 %
(PROMEDIO)	100 %	90 %	0 %	0 %	99,9 %
<i>Miconia caudata</i>	99,9 %	80 %	0 %	0 %	99,9 %
	99,9 %	80 %	0 %	0 %	99,9 %
	99,9 %	80 %	0 %	0 %	99,9 %
(PROMEDIO)	99,9 %	80 %	0 %	0 %	99,9 %
<i>Clidemia hirta</i>	99,9 %	0 %	0 %	0 %	99,9 %
	99,9 %	0 %	0 %	0 %	99,9 %
	99,9 %	0 %	0 %	0 %	99,9 %
(PROMEDIO)	99,9 %	0 %	0 %	0 %	99,9 %
<i>Hamelia patens</i>	100 %	99 %	35 %	0 %	99,9 %
	100 %	99 %	35 %	0 %	99,9 %
	100 %	99 %	35 %	0 %	99,9 %
(PROMEDIO)	100 %	99 %	35 %	0 %	99,9 %

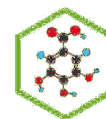
GRUPO POLIFENOLES UTP



BIBLIOGRAFIA

- [1] Cosa, Paul; Vlietinck, Arnold J.; Vanden Berghe, Dirk; Maesa, Louis. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *In vitro* 'proof-of-concept'. En: Journal of Ethnopharmacology N° 106 (2006); 290–302..
- [2] S. Garg; J. Naidu; S.M. Singh; S.R. Nawange; N. Jharia; M. Saxena. In vitro activity of terbinafine against Indian Clinical isolates of *C. albicans* and non-albicans using a macrodilution method. En: Journal de Mycologie Médicale N° 16 (2006); 119–125
- [3] Abarca, M^a Lourdes. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. En: Rev Iberoam Micol N° 17 (2000); S79-S84
- [4] Omidbeygi, Maryam; Barzegar, Mohsen; Hamidi, Zohreh; Naghdibadi, Hassanali. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus Xavus* in liquid medium and tomato paste. En: *Food Control* 18 (2007); 1518–1523
- [5] Catalán, Alfonso; Pacheco, Juan G.; Martínez, Alejandra; and Mondaca, Maria A. *In vitro* and *In vivo* activity of *Melaleuca alternifolia* mixed with tissue conditioner on *Candida albicans*. En: Catalán et al; March 2008; Concepción, Chile
- [6] Rivero López, Migue; Álvarez González, Manuel; López Acosta, Tania; y González Cáceres, Juana. Actividad antifúngica *In Vitro* del *Pinus caribea* (*pino macho*). En: Rev. Cubana de Plant Med. 2(1) (1997); 25-29.
- [7] B. A. Alanís Garza; G. M. González González; R. Salazar Aranda; N. Waksman de Torres and V. M. Rivas Galindo. Screening of Antifungal Activity of Plants from the Northeast of Mexico. En: Journal of Ethnopharmacology 114 (2007); 468–471.
- [8] <http://sameens.dia.uned.es/Trabajos3/T1A/MorcilloRubioMP/Agente.htm>.
Citada en la fecha: 08/17/07
- [9] http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/1053.htm
Citada en la fecha: 11/15/07

GRUPO POLIFENOLES UTP



[10] <http://hongos-alergenicos.reviberoammicol.com/files/025.PDF>.

Citada en la fecha: 11/18/07

[11] Rojas, Florencia; Mangiaterra, Magdalena; Giusiano, Gustavo. Hongos levaduriformes en neonatos. Frecuencia y sensibilidad antifúngica. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2004. Universidad Nacional del Nordeste.

[12] Mrudula, Patel; Maeve, M. Coogan. Antifungal activity of the plant *Dodonaea viscosa* var. *angustifolia* on *Candida albicans* from HIV-infected patients. En: *Journal of Ethnopharmacology* 118 (2008); 173–176.

[13] Álvarez L., María Elena; Isaza M.; Gustavo; Echeverri, Harold Mauricio. Efecto antibacteriano in vitro de *Austroeupatorium inulaefolium* H.B.K. (Salvia amarga) y *Ludwigia polygonoides* H.B.K. (Clavo de laguna). En: Biosalud revista ciencias básicas.

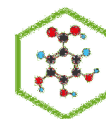
[14] Márquez Vizcaíno, Rita Luz; Mercado Pérez, Angelina; Vargas Montero, Claudia; De La Rosa Torres, Catalino. Actividad antibacterial de *Pedilanthus tithymaloides* (L.) poit (ultimorrial). En: Actualidades biológicas (suplemento), volumen 27. 2005, p 21. ISSN 0304-3584.

[15] Márquez Vizcaíno, Rita Luz; De La Rosa Torres, Catalino; Mercado Pérez, Angelina. 2007 Actividad antifúngica del extracto total en etanol de la hojas frescas de *Pedilanthus tithymaloides* L poit (ultimorrial). En: Scientia et Technica, Universidad Tecnológica de Pereira – Año XIII, No 33 mayo de 2007. Pág. 155.

[16] García Barriga, H.; *Flora Medicinal de Colombia*. Botánica Médica. 2ed. Vol.2, Santafé de Bogotá: Tercer Mundo editores. 312-318(1992).

[17] Shii, R.; Inhibitory Effects of Hidrolyzable Tannins from *Melastoma Dodecandrum* Luor on Nitric Oxide Production by a Murine Macrophage-Like cell Line, RAM264.7, Activated whit Lipopolysaccharide and Interferon-gama. En: Biol. Pharm. Bull., 22(6); (1999). 647-653.

GRUPO POLIFENOLES UTP



[18] Teran Aguilar, Jeremy Jehizon. Diversidad de la Familia Rubiaceae en el Parque Nacional Carrasco (Limbo Palmar y Guacharos). Proyecto de Grado. Cochabamba; Bolivia. Mayo, 2006

[19] <http://www.arbolesornamentales.com/Hameliapatens.htm>

Citada en la fecha: 01/22/08

[20] <http://www.unincca.edu.co/tesis/FTWeb/Rubiaceae.html>

Citada en la fecha: 01/22/08

[21] Brooks Geo F.; Butel Janet S.; Morse Stephen A.; Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Manual moderno editorial, 16a edición; México DF. Santa Fe de Bogota. Pág. 709 - 710

[22] Alcalá, Luis; Muñoz, Patricia; Peláez, Teresa y Bouza, Emilio. Aspergillus y aspergilosis. En: CONTROL CALIDAD SEIMC. Servicio de Microbiología Clínica. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid

[23] <http://www.deanza.edu/faculty/mccauley/6a-labs-fungi-01.htm>

[24] <http://www.sci.muni.cz/mikrob/Miniatlas/asp-ni.htm>

Citada en la fecha: 23/10/07

[25] <https://fungalgenomics.concordia.ca/fungi/Anig.php>

Citada en la fecha: 07/12/07

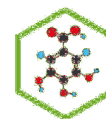
[26] http://sameens.dia.uned.es/Trabajos3/T1A/MorcilloRubioMP/img/aspergillus_niger.jpg. Citada en la fecha: 07/12/07

[27] Brooks Geo F.; Butel Janet S.; Morse Stephen A.; Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Manual moderno editorial, 16a edición; México DF. Santa Fe de Bogota. Pág. 732 – 737

[28] Pardi Germán; Cardozo Elba Inés; Algunas Consideraciones sobre *Candida albicans* como agente Etiológico de Candidiasis Bucal. Acta odontológica Venezolana; volumen 40 nº 1 / 2002.

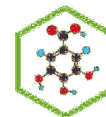
[29] Ruiz, Lady Johanna; Álzate, Andrés Felipe. Actividad in-Vitro anti *Candida albicans* de las fracciones del homogenizado en Isopropanol-agua (65:35) de *Tibouchia multiflora* y sus derivados. Tesis UTP. 2006

GRUPO POLIFENOLES UTP



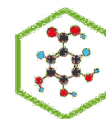
- [30] Brooks Geo F.; Butel Janet S.; Morse Stephen A.; Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Manual moderno editorial, 16a edición; México DF. Santa Fe de Bogota. Pág. 742 – 750
- [31] Mendoza, Humberto; Ramírez, Bernardo. Guía Ilustrada de géneros de *Melastomataceas* y *Memecylaceae* de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos. Enero, 2006; p. 173-174
- [32] <http://www.ecologia.info/saltarines.htm>
Citada en la fecha: 15/08/07
- [33] Díaz, Silvia Juliana. Fraccionamiento guiado por bioensayo de la actividad antibacteriana contra *Salmonella gallinarum* y *Escherichia coli* del extracto Isopropanol-agua (65:35) de *Tibouchina ciliaris*. Tesis UTP. 2004
- [34] Phylogeny and Classification of the Melastomataceae. En: Nordic Journal of Botany.
- [35] http://www.eco-index.org/search/pdfs/299report_5.pdf
Citada en la fecha: 15/08/07
- [36] http://www.cybertruffle.org.uk/vinales/esp/clidemia_hirta.html
Citada en la fecha: 13/02/08
- [37] http://www.dipbot.unict.it/sistematica_es/Rubi_fam.html
Citada en la fecha: 01/23/08
- [38] www.kingsnake.com/westindian/viridaeplantae5.html
- [39] Mendoza, Humberto; Ramírez, Bernardo; Jiménez, Luis Carlos. Rubiaceae de Colombia, Guía ilustrada de géneros. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Programa Inventarios de Biodiversidad. Grupo de Exploración y Monitoreo Ambiental – GEMA
- [40] <http://www.arbolesornamentales.com/Rubiaceae.htm>
Citada en la fecha: 01/22/08
- [41] National, C., for, Clinical, Laboratory, Standards. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar. NCCLS 1997. Volumen 17, número 1.

GRUPO POLIFENOLES UTP



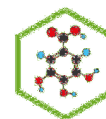
- [42] National, C., for, Clinical, Laboratory, Standards. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar. NCCLS 1999. Volumen 19, número 1.
- [43] National, C., for, Clinical, Laboratory, Standards. Manual de Control de Calidad en el Laboratorio Clínico, ISP 1998. p 7.18-7.21.
- [44] MJ, A. Determination of Minimum Inhibitory Concentration. En: J Antimicrob Chemother Vol. 48(31). 2001. 5-16.
- [45] García Rodríguez, José A.; Cantón, Rafael; García Sánchez, J. Elías; Gómez, M^a Luisa. Métodos Básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos 2000. En: procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- [46] Méndez, Johana y Herrera, Marco L. Métodos de susceptibilidad antifúngica: revisión metodológica. En: Rev. méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica), 2001, vol.36, no.1-2, p.37-44. ISSN 1017-8546.
- [47] Vélez, Patricia E.; Posada, Francisco J.; Marín, Patricia, Bustillo, Alex E.; González, Maria Y Osorio. Eduardo. Metodología para el control de calidad de formulaciones de hongos entopatógenos: Disciplina de etnología. Chinchiná, Caldas, Centro Nacional de Investigaciones de Café "Pedro Uribe Mejía", Abril, 1996. p.12.
- [48] Calle, Lina Marcela; Jiménez, Francisco Javier. 2002. Actividad Ictiotóxica, antiviral y antifúngica de polifenoles de extracto de acetato de etilo de *Miconia coronata*. Universidad Tecnológica de Pereira, facultad de tecnología, programa de Tecnología Química, Grupo de Polifenoles. 2002.
- [49] Marín Castaño, Darwin; Bonilla Rodríguez, Ingrid Paola. Actividad antibacteriana contra *Salmonella gallinarum* y *Escherichia coli* del extracto en acetona acuosa (70%) de *Miconia coronata*. Tesis UTP 2004
- [50] Hamza, Omar J.M.; J.P., Carolien; Matee, Mecky I.N.; Moshi, Mainen J.;all et. Antifungal activity of some Tanzanian plants used traditionally for the treatment of fungal infections. En: Journal of Ethnopharmacology 108 (2006) 124–132

GRUPO POLIFENOLES UTP



- [51] Eui-Ju HONG; Ki-Jeung NA; In-Gyu CHOI; Kyung-Chul CHOI; y Eui-Bae JEUNG. Antibacterial and Antifungal Effects of Essential Oils from Coniferous Trees. En: *Biol. Pharm. Bull.* 27(6), 2004. Pág. 863-866.
- [52] K.L. Lahtchev a, D.I. Batovska b,* , St.P. Parushev b, V.M. Ubiyvovk c, A.A. Sibirny Antifungal activity of chalcones: A mechanistic study using various yeast strains. *European Journal of Medicinal Chemistry* xx (2008) 1e9
- [53] Pinto, Eugenia; Ribeiro Salgueiro, Ligia; Cavaleiro, Carlos; Palmeira, Ana; Gonzalves, Maria José. *In vitro* susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of *Salvia of.cinalis*. En: *Industrial Crops and Products* 26 (2007) 135–141
- [54] A. Moredo, M. F. Landoni, C. J. Perfumo. Concentración Inhibitoria Mínima de Tilmicosina y Eritromicina frente a cepas ce *Actinobacillus pleuropneumoniae* aisladas en la República Argentina. *Trabajos de Investigación, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. ANALECTA Veterinaria* 2001; 21, 2: 6-11
- [55] Isaza, José H.; Ito, Hideyuki; Yoshida, Takashi. Oligomeric hydrolyzable tannins from *Monochaetum multi.orum*. En: *Phytochemistry* 65 (2004) 359–367
- [56] S. Gargb, J. Naidub, S.M. Singha, S.R. Nawangea, N. Jhariaa, M. Saxenab. *In vitro* activity of terbinafine against Indian clinical isolates of *Candida albicans* and non-*albicans* using a macrodilution method. En: *Journal de Mycologie Médicale* 16 (2006) 119–125
- [57] Narumol Matana; Nirundorn Matanb. Antifungal activities of anise oil, lime oil, and tangerine oil against molds on rubberwood (*Hevea brasiliensis*). En: *International Biodeterioration & Biodegradation* 62 (2008) 75–78.
- [58] Omidbeygi, Maryam; Barzegar, Mohsen; Hamidi, Zohreh; Naghdibadi, Hassanali. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus Xavus* in liquid medium and tomato paste. En: *Food Control* 18 (2007) 1518–1523.

GRUPO POLIFENOLES UTP



[59] M. A. Pfaller; D. J. Sheehan; y J. H. Rex. *Determination of Fungicidal Activities against Yeasts and Molds: Lessons Learned from Bactericidal Testing and the Need for Standardization.* En: *Clinical Microbiology Reviews.* Abr. 2004; p. 268-280.

[60] Evaluación *in Vitro* de fungicidas para el control del hongo *Macrophoma* sp., agente causal de la pudrición apical del fruto del Guayabo (*Psidium guajava* L.). En: *Rev. Fac. Agron. (LUZ).* 1997, 14: 233-244. Departamento Fitosanitario, Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

[61] S. Garg; J. Naidu; S.M. Singha; S.R. Nawange; N. Jharia; M. Saxena. In vitro activity of terbinafine against Indian clinical isolates of *Candida albicans* and non-*albicans* using a macrodilution method. En: *Journal de Mycologie Médicale* 16 (2006) 119–125.

[62] Yun-Liang Yanga, An-Huei Wangb, Chih-Wei Wangb, Wei-Ting Chengb, Shu-Ying Lic, Hsiu-Jung Lob. Susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of *Candida* species in Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance of Yeasts. En: *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 61 (2008) 175–180.